

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА
КАТЕДРА „КОНСЕРВАТИВНО ЗЪБОЛЕЧЕНИЕ“
Ръководител: проф. д-р Радосвета Василева, дм

Д-р Александър Бойчев Бончев

**Дисертационен труд за придобиване на
образователната и научна степен „доктор“**

**Биомиметична реминерализация при начални
емайлови кариозни лезии по гладки повърхности**

Докторска програма

Научен ръководител

проф. д-р Радосвета Иванова Василева, дм

Научен консултант

Проф. д-р Елена Йоакимова Дюлгерова-Танева, дмн, дх

София, 2021 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	8
1. Начална емайлова кариозна лезия.....	8
1.1. Механизъм на възникване на начална емайлова кариозна лезия.....	9
1.2. Класификация и клинична диференциална диагноза на емайлови лезии.....	10
1.3. Начални кариозни емайлови лезии при ортодонтско лечение...	11
2. Откриване, оценка и диагноза на емайловите кариозни лезии.....	12
3. Методи за ранно откриване, оценка и диагноза на емайлови кариозни лезии.....	19
4. Системи за реминерализация на емайла.....	26
5. Реминерализиращи системи, допълващи действието на флуоридите....	30
6. Биомиметична реминерализация.....	34
6.1. Биологични основи на биомиметичната реминерализация.....	35
6.2. Протеин-медиран подход в реминерализацията на емайла.....	36
7. Модел на изкуствен кариес.....	38
8. Биомиметични реминерализиращи системи.....	40
8.1. Биомиметични агенти, базирани на пептиди.....	41
8.2. Биомиметични агенти, базирани на аминокиселини.....	45
8.3. Биомиметични агенти, базирани на амелогенин-съдържащи хидрогелове.....	46
8.4. Биоминерализиращи агенти, базирани на дендримерна струкура.....	46
8.5. Биомиметични агенти, базирани на калциево-фосфатни наночастици.....	48

8.6. Нанохидроксилапатит.....	48
9. Анализ на литературния обзор.....	50
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	54
СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.....	54
IV. МАТЕРИАЛ.....	55
По задача 1.....	55
По задача 2.....	57
По подзадача 2.1.....	58
По задача 3.....	58
По задача 4.....	59
V. МЕТОДИ.....	61
По задача 1.....	61
По задача 2.....	68
По подзадача 2.1.....	73
По задача 3.....	74
По задача 4.....	83
СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ.....	93
VI. РЕЗУЛТАТИ.....	94
По задача 1.....	94
По задача 2.....	101
По подзадача 2.1.....	115
По задача 3.....	117
По задача 4.....	133
VII. ОБСЪЖДАНЕ.....	147
По задача 1.....	147
По задача 2.....	153

По подзадача 2.1.....	160
По задача 3.....	162
По задача 4.....	168
VIII. ИЗВОДИ.....	175
IX. КНИГОПИС.....	176
X. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	208

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕДГ	Емайло-дентинова граница
ИЧ спектроскопия	Инфрачервена спектроскопия
КАП	Карбонатапатит
КСФ	Количествена светлинна флуоресценция
ЛКО	Линеен коефициент на отслабване
ЛФ	Лазерна флуоресценция
МХДФ	Метилхидроксидифосфат
НЕР	Направлявана емайлова регенерация
НТМФ	Натриев триметафосфат
ПДМАЕМА	Поли-2-(диметиламино)етил метакрилат
ПСБ	Полисулфобетаин
РС	Раманова спектроскопия
СЕМ	Сканираща електронна микроскопия
СЗО	Световна здравна организация
ХАП	Хидроксилапатит
АСР	Аморфен калциев фосфат
СРР	Казеин фосфопептид
СаР	Калциев фосфат
Glu	Глутамат
ICDAS	International Caries Detection and Assessment System
VHN	Vicker's Hardness Number
mbar	Милибар
M	Моларност
v/v%	Обемна концентрация
mm	Милиметър
cm	Сантиметър
nm	Нанометър
Å	Ангстром = 0,0001 микрона
cm ⁻¹	Реципрочен сантиметър
v	Вълнов вектор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Зъбният кариес е най-широко разпространеното заболяване в света и продължава да бъде основен здравен проблем на обществото, въпреки значителния напредък на технологиите през последните години. Въвеждането на флуоридите в профилактиката на кариеса значително редуцира тежестта и разпространението на заболяването, но последните епидемиологични данни сочат, че ефективността на този подход е незадоволителна. Това може да се обясни с ограничения реминерализиращ потенциал на флуорните препарати. В редица проучвания е установено, че те осъществяват ефекта си в повърхностните 30-50 μm от лезията, докато навлизането им в по-дълбоките слоеве е минимално. Повишаването на средната продължителност на живота и запазването на зъбите в устната кухина за по-продължителен период, може да доведе до увеличаване честотата на кариеса. Следователно ранното диагностициране на кариозните лезии и определяне на тяхната активност, е от съществено значение за управлението на кариозния процес.

Зъбният емайл е ацелуларна структура и няма способността да регенерира самостоятелно. Промяната на лечебния подход от оперативен към неоперативен и превантивен, изисква развитието на по-детайлни и обективни методи за ранна кариесна диагностика, а също и създаването на нови средства, които да реконструират увредената цялост на хидроксилапатитния кристал във вътрешността на лезията. Разликата във физикомеханичните и химичните свойства на възстановителните материали, спрямо тези на естествените зъбните структури, е една от основните причини за неуспехите при денталните възстановявания.

Разработването на материали, чиито механични и естетични качества се доближават до тези на емайла, представлява интерес за изследователите и е в основата на т.нар. биомиметичен подход при реминерализацията на

емайла. Терминът *биомиметика* означава „изучаване на естествените механизми на формирането и функционирането на биологични структури с цел синтезирането на подобни продукти“. В контекста на емайловата биоминерализация, биомиметичният подход представлява стратегия за реминерализация на емайловата структура чрез възстановяване на увредените зони, използвайки нанопрекурсори от аморфен калциев фосфат, стабилизирани чрез мрежа от неколагенови протеини. За разработването на средства за реминерализация на емайла, е необходимо задълбочено познаване на основни химични и биологични процеси относно организацията на екстрацелуларния матрикс и контрола на кристалното зародишообразуване и растеж.

Доскоро се считаше, че конвенционалното лечение на емайлови лезии включва използването на ротиращи инструменти и последващото obtуриране с възстановителни материали. Познанието за процеса на реминерализация доведе до развитието на нови технологии, промотиращи емайловата реминерализация, която е в основата на идеологията за минимално инвазивна дентална медицина.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. НАЧАЛНА ЕМАЙЛОВА КАРИОЗНА ЛЕЗИЯ

Зъбният кариес е резултат от сложното взаимодействие между емайловата повърхност и бактерии, които са организирани в плаков биофилм и образуват киселини, предизвиквайки подповърхностна деминерализация на емайла [3, 5, 6, 7, 17, 285]. Съвременната наука определя кариеса като мултифакторно заболяване, чието развитие зависи от баланса между защитни и рискови етиологични фактори (табл. 1) [126, 248]. Съвкупността от фактори се различава за всеки човек, всеки зъб и дори за всяка зъбна повърхност [21, 26].

Таблица 1. Фактори, свързани с развитието на кариозна лезия.

РИСКОВИ ФАКТОРИ	ЗАЩИТНИ ФАКТОРИ
<ul style="list-style-type: none">- Чест прием на прости въглехидрати;- Намален реминерализиращ потенциал на слюнката;- Присъствие на ацидогенни и ацидурични микроорганизми.	<ul style="list-style-type: none">- Аплициране на противомикробни препарати;- Нисковъглехидратна диета;- Нормален реминерализиращ потенциал на слюнката и нормални нива на секреция;- Използване на флуорид-съдържащи продукти.

На базата на знанията за етиопатогенезата на кариозния процес, е създадена и концепцията за „балансиран кариес“ от *Featherstone* [130, 131, 168]. Според нея, ако равновесието между рисковите и протективните фактори е запазено, клинично установима кариозна лезия няма да се развие. В случай, че патологичните фактори се увеличат и комбинират, е възможно да се наруши балансът между де- и реминерализация, в посока деминерализация [21, 50, 134]. Ако тези условия се задържат по-дълго време, е възможно да възникне кариозна лезия.

1.1. Механизъм на възникване на начална емайлова кариозна лезия

Развитието на кариозна лезия е относително бавен процес, който изисква продължителни периоди на киселинно въздействие върху емайла, при което започва неговото разтваряне ($\text{pH} < 5.5$) [132, 136, 385, 407]. Формирането на началната подповърхностна емайлова лезия се дължи на физикохимичните особености в разтварянето на хидроксилапатита от емайловите призми. Механизмът на деминерализацията зависи от транспортирането на водородни йони от киселините в зъбната плака към подлежащия емайл при $\text{pH} = 5.0$ [20, 317]. В периоди на активно производство на киселини от ацидогенните микроорганизми, концентрационният градиент на водорода е много по-нисък в емайла, отколкото в плаковия биофилм. Водородните йони се транспортират към напредващия фронт на лезията и разтварят хидроксилапатита [6, 322]. В резултат на това разтворените минерали се пренасят към плаковия биофилм. По време на периодите на реминерализация, при повишаване на стойностите на pH , частично разтворените кристали могат да бъдат възстановени или се образуват нови. При повишени нива на калциеви, фосфатни и флуорни йони в плаката, деминерализацията може да бъде затруднена [172].

Основавайки се на така описаната специфичност в развитието на лезията, идеологията на *Featherstone* създава модел за контрол на зъбния кариес като процес. Този модел изисква предварителна оценка на патологичните и протективните фактори, което обуславя и съвременната концепция за оценка на риска от кариес при управлението на кариозния процес [25, 131].

1.2. Класификация и клинична диференциална диагноза на началните емайлови кариозни лезии

Началната емайлова лезия, се характеризира с четири ясно различими хистопатологични зони [340, 341] (табл.2):

Таблица 2. Хистопатологични зони на началната емайлова лезия.

ЗОНИ НА ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ	
Транслуцентна зона	Наличие на 1 % пори; зоната е разположена в напредващия фронт на лезията.
Тяло на лезията	Повече от 5-25 % от обема е съставен от пори. Представлява по-голямата част от лезията и се разполага на 15-30 μm под интактната емайлова повърхност.

ЗОНИ НА РЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ	
Тъмна зона	Разположена е в близост до напредващия фронт на разтварянето на емайла, непосредствено над транслуцентната зона. Количеството пори възлиза на 2-4%.
Повърхностна зона	Формира интактния, най-външно разположен слой на лезията. Количеството пори е <5% от общия обем.

Подповърхностната деминерализация на емайла води до образуването на пори между емайловите призми. В резултат от това се увеличава рефракционният индекс на емайла в областта на лезията. По-голямото количество разсеяна светлина определя промяната в емайловата транспарентност [152]. По този начин възниква първият клиничен признак за развитието на кариозна лезия – т. нар. „бяло петно“. Терминът *емайлово бяло петно* включва няколко нозологични единици, които могат да бъдат класифицирани по следния начин [171]:

1. Кариозни бели емайлови лезии при пациенти без ортодонтоско лечение;

2. Кариозни бели емайлови лезии при пациенти, провеждащи ортодонтска терапия;
3. Некариозни бели емайлови лезии: флуороза, смущения в развитието: хипоминаерализация, емайлова хипоплазия и др.

За да бъде направена диференциална диагноза между кариозните и некариозните бели емайлови петна, зъбната повърхност трябва да бъде добре почистена, подсушена и осветена. Кариозните лезии са грапави, матови и порьозни. В повечето случаи те се разполагат по букалните повърхности под голямо количество плака или около елементите на фиксираната ортодонтска техника, където оралната хигиена е затруднена [157]. Некариозните бели емайлови лезии са предимно с гладка и лъскава повърхност. Те обхващат непредилекционни места за развитие на кариес, генерализирани са и засягат симетрични зъби [384].

Обединяването на няколко нозологични единици в общо название се счита за неточно и в последните години в литературата има насоки терминът бяло петно да се замести с некавитирана емайлова кариозна лезия [64].

1.3. Начални кариозни емайлови лезии при ортодонтско лечение

Ортодонтските апарати затрудняват оралната хигиена, а неравностите около композитните цименти, използвани за фиксирането на брекетите, увеличават плаконатрупването [107, 258, 353]. В резултат от това може да възникнат емайлови кариозни лезии в съседство с брекетите. Обикновено те са разположени по букалните повърхности и нарушават естетичния вид на съзъбието [174, 152, 312, 315, 352].

Gorelick и кол. определят като основни рискови фактори за развитието на ранни букални кариозни лезии при ортодонтски лекувани пациенти особеностите на емайловата повърхност, достъпът на слюнка до

нея и разстоянието между гингивата и брекета [152]. Фиксираните ортодонтски апарати значително променят микроорганизмовия състав на плаковия биофилм. Доказано е, че се повишава микробното число на ацидогенните бактерии, като *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* [171, 199, 242].

След премахването на ортодонтските апарати се наблюдава спонтанно обратно развитие на част от възникналите лезии. Това се дължи на естествената реминерализация от слюнката и улесняването на оралната хигиена [157, 212]. При по-напреднали случаи този подход е недостатъчен и е необходимо прилагането на професионални реминерализиращи средства [404].

Флуорните препарати имат положителен ефект в превенцията на началните кариозни лезии по време на ортодонтската терапия, но имат незадоволителна ефективност при лечението на вече възникналите некавитирани кариозни лезии [103, 275, 286]. Използването на нефлуорните калциево-фосфатни агенти за реминерализация показва също противоречиви резултати [137, 308]. От друга страна, въвеждането на биомиметичните реминерализиращи агенти в клиничната практика дава обещаващи резултати при лечението на начални кариозни лезии [36, 42, 192, 288].

2. ОТКРИВАНЕ, ОЦЕНКА И ДИАГНОЗА НА ЕМАЙЛОВИТЕ КАРИОЗНИ ЛЕЗИИ

В последните години няколко основни термина в диагностиката на кариеса биват ясно дефинирани: (1) **откриване на лезията** – използва се обективен метод, който установява налична ли е лезия или не; (2) **оценка на лезията** – наблюдение и описание на лезията, след като вече тя е била открита; (3) **диагноза на кариеса** – обобщение на цялата информация за

заболяването и индивида, и определяне на алгоритъма за управление на кариозния процес [71, 292].

Надеждният диагностичен метод открива ранните промени в структурата на емайла и е удобен за приложение в клиничната практика [274]. Диагностичната му способност се определя от показателите чувствителност и специфичност [40]. **Чувствителност** е свойството на метода да установи с точност всички зъбни повърхности, засегнати от кариес, а **специфичност** – откриването на всички здрави повърхности. Тези показатели се изчисляват в интервала между 0 и 1 (100%) като стойностите близо до 1 доказват висока прецизност. Ранната диагностика на кариеса изисква методи, чиято чувствителност е поне 0,75, а специфичността им надхвърля 0,85 [207, 365].

2.1. Визуален метод за диагностика и скали за регистрация на зъбния кариес

Конвенционалните методи за ранна кариесна диагностика включват визуално-тактилният преглед, рентгенографски метод (конвенционален и дигитален), оцветителен метод [27, 139] и др. При тях се разчита предимно на субективната оценка на клинициста за показатели като цвят, повърхностна текстура и локализация. По този начин се прави т.нар. дихотомично решение за отсъствие или наличие на кариозна лезия [207]. Тези методи се отличават с ниска чувствителност и висока специфичност, поради което голям брой лезии могат да бъдат пропуснати. Въз основа на визуалния метод и някои характеристики на кариозните лезии, се създават индекси за стандартизирането и описанието им.

Една от най-широко използваните и познати системи за регистрация на кариозните лезии е DMF (*Decay, Missing, Filling; DMFT, DMFS*) индексът на Световната здравна организация (СЗО). Въпреки че е лесно приложим, индексът има своите недостатъци: не регистрира повърхностите с риск от

развитие на кариес, не отчита активността на кариозния процес и не определя лезиите като обратими или необратими [21, 251]. Необходимостта от компенсирането на тези слаби страни на DMF, стимулира развитието на други индекси като: American Dental Association Caries Classification System (ADA CCS), Caries Assessment Spectrum and Treatment Instrument (CAST), International Caries Detection and Assessment System (ICDAS), Nyvad Criteria for Assessment of Caries Lesion Activity and Severity, Universal Visual Scoring System (UNIVISS) и др. [139].

2.2. Международна система за откриване и оценка на кариеса (International Caries Detection and Assessment System - ICDAS)

Системата ICDAS е задълбочено проучена и хистологично потвърдена [115, 116, 290]. Чрез визуална оценка се определя стадият на развитие на кариозните лезии и активността им при първичен и вторичен кариес на короната и корена [120, 190, 289, 290]. Използва се двуцифрена система за регистрация: първата цифра описва статуса на зъбната повърхност, а втората – стадия на развитие на кариозния процес (табл. 3).

За улеснение в клиничната практика се предлага използването на три стадия в развитието на кариеса: **начален** стадий (ICDAS кодове 1 и 2), **среден** стадий (ICDAS кодове 3 и 4) и **напреднал** стадий (ICDAS кодове 5 и 6) [188]. В системата е посочен и обемът от лечебно-профилактични действия, които трябва да се извършат при съответните кодове. Това подпомага лекарите по дентална медицина в ежедневната им практика [139].

Дефинирането на активността на кариозната лезия в нейния некавитиран стадий е от особено значение, защото е възможно провеждането на неоперативно, превантивно лечение [291]. В последния вариант на ICDAS е разработена схема за оценка на активността на лезията. Тя се изчислява въз основа на локализацията, визуалната оценка,

тактилното усещане при сондиране и гингивалното кървене. Когато сборът е повече от 7 точки, лезията се определя като активна (фиг. 1).

Таблица 3. Описание на промените в зъбните структури по системата ICDAS.

Кариес на зъбната корона		
ICDAS код	Характеристика	Описание
0	Интактна зъбна повърхност	Не се откриват промени по емайловата повърхност дори след продължително подсушаване (повече от 5 секунди).
1	Първа визуална промяна в емайла	При визуално наблюдение на влажна повърхност липсват промени, но след продължително подсушаване се установява промяна в прозрачността на емайла (бяла или кафява лезия). Целостта на емайловата повърхност е запазена.
2	Отчетлива визуална промяна в емайла	Установява се промяна в емайла (бяла или кафява лезия) при визуално наблюдение на влажна зъбна повърхност. Целостта на емайловата повърхност е запазена.
3	Локализирано нарушаване на емайловата повърхност	При наблюдение на влажна зъбна повърхност има промяна в опакитета на емайла (бяла или кафява лезия). След подсушаване от пет секунди се установява нарушаване на целостта на емайловата повърхност. При необходимост лезията внимателно се сондира със сонда със заоблен връх.
4	Подлежаща тъмна сянка от кариес в дентина	Цветът се дължи на кариес, развиващ се в дентина, а емайловата повърхност е с относително запазена цялост. Ако има нарушаване на целостта, не се установява видим подлежащ дентин. При влажна зъбна повърхност промените в цвета са по-видими.
5	Кавитирана лезия с открит дентин	След подсушаване за 5 секунди се установява нарушена цялост на емайла и разкриване на подлежащия дентин.
6	Обширна кавитирана лезия с открит дентин	Дентинът е ясно открит във всички части на лезията. Обширната лезия обхваща поне половината от зъбната повърхност и в някои случаи може да достигне до зъбната пулпа.



Фиг. 1. Оценка активността на кариозната лезия. Предиктивната стойност на всеки параметър е обозначена с цифри. Ако сборът на цифрите от оценката на съответните параметри е <7, лезията е стационарна. Ако сборът е >7, лезията се определя като активна.

2.3. Скала на Nyvad

Скалата на Nyvad се различава от ICDAS по това, че оценява предимно активността и патоанатомичните промени, които се наблюдават при кариозни лезии, докато дълбочината им е от второстепенно значение [273]. Критериите на Nyvad определят две степени на тежест при развитието на кариозния процес: некавитирани и кавитирани кариозни лезии (табл. 4).

Въпреки че критериите за оценка на активността в ICDAS системата до голяма степен са взаимствани от скалата на Nyvad, има някои съществени различия. Сондирането при Nyvad се извършва посредством остра сонда, докато при ICDAS се използва сонда със заоблен връх, за да се избегне механичното нараняване на повърхността [21, 289]. При системата на Nyvad, изчисляването на тежестта на лезията и активността ѝ се комбинира в една обща скала, докато при ICDAS се извършва чрез две отделни скали. Едновременното използване на двете системи би могло да подобри точното диагностициране на лезиите и оценката на ефекта от приложения превантивен и/или лечебен подход.

Таблица 4. Описание на промените в зъбните структури по скалата на Nyvad.

Nyvad код	Характеристика	Описание
0	Интактна повърхност	Нормална емайлова транспарентност и текстура на зъбната повърхност.
1	Активна, некавитирана лезия	Зъбната повърхност е с тебеширено бял/жълтеникав цвят, покрита с плака, без блясък и грапава при сондиране. Клинично не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена близо до гингивалния ръб.
	Активна, кавитирана лезия	
2	Нарушена цялост на зъбната повърхност	Характеристиките на лезията са същите като при код 1. Локализиран дефект (микрокавитация) в емайла.
3	Кавитация	Кавитация в емайла/дентина, при сондиране повърхността е мека, възможно е засягане на пулпата.
4	Неактивна, некавитирана лезия	Бяла, кафеникава или черна на цвят лезия. Повърхността е твърда, гладка при сондиране, с блясък. Не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена на разстояние от гингивалния ръб.
	Неактивна, кавитирана лезия	
5	Нарушена цялост на зъбната повърхност	Характеристиките на лезията са същите като при код 4. Наблюдава се повърхностен дефект (микрокавитация) в емайла.
6	Кавитация	Кавитация в емайла/дентина, повърхността може да бъде със запазен блясък; твърда консистенция при сондиране. Не се установява засягане на пулпата.
7	Обтурация	
8	Обтурация + активна кариозна лезия	Активна кариозна лезия в контакт с обтурация, може да бъде кавитирана или некавитирана.
9	Обтурация + неактивна кариозна лезия	Неактивна кариозна лезия в контакт с обтурация, може да бъде кавитирана или некавитирана.

В България се прилага диагностична скала на кариеса, използвана в Катедра по детска дентална медицина – София [19]. Диагностичните кодове са следните:

D0 – здрав емайл. Емайлът е със запазен цвят, блясък, прозрачност и гладкост. Липсва плаков биофилм. Не се открива присъствие на кариозен процес.

D1a – най-ранният стадий на емайлова лезия. Откриват се под голямо количество плака, обикновено с цервикална локализация. Емайлът е загубил блясъка си. Откриват се след почистване на зъбната плака с професионална хигиена. Необходимо е продължително подсушаване.

D1b – бяла емайлова лезия, видима след предварително почистване и подсушаване. Тя може да бъде активна, стационарна или регресирала. В този стадий може да се открие микропоръзност, но няма емайлова кавитация.

D2 – бяла емайлова лезия, видима без подсушаване. Повърхността е загубила гладкост, открива се грапавина. Могат да се открият една или няколко малки кавитации или една по-голяма и по-дълбока. Около тях обикновено се разполага дифузна бяла активна лезия.

D3a – дентинов кариес. Тук се включват скритите и откритите дентинови лезии. Скритите се забелязват по промяна в цвета на запазения емайл. Откритите представляват кавитиран дентинов кариес, при който има загуба на емайл и дентин.

D3b – лезия, засягаща вътрешната половина на дентина. Обикновено е кавитирана и лесна за диагностика.

D4 – кариозни лезии, преминали през целия слой дентин и засегнали пулпата или периодонциума.

3. МЕТОДИ ЗА РАННО ОТКРИВАНЕ, ОЦЕНКА И ДИАГНОЗА НА ЕМАЙЛОВИ КАРИОЗНИ ЛЕЗИИ

Визуалната диагностика на началните кариозни лезии не може да улови структурните промени, които настъпват в емайла преди появата на първите видими дефекти [21, 255, 354]. Комбинирането на традиционните диагностични методи с по-прецизни, съвременни подходи, значително подобрява ранната кариесна диагностика [4]. Чрез тях може детайлно да се проследи ефектът от неоперативното лечение на лезиите. Съвременните методи за ранно откриване, оценка и диагноза на емайловата лезия могат да бъдат класифицирани по следния начин [43, 139, 253, 254, 328]:

Класификация на съвременни методи за ранна диагностика на емайлов кариес:

1. Диагностични методи, използващи трансилюминацията на светлина:

- Фиброоптична трансилюминация (FOTI), дигитална фиброоптична трансилюминация (DIFOTI) – *Dialux, Microlux*;

- Трансилюминация със светлина от близко-инфрочервения спектър – *DiagnoCam*;

2. Диагностика на принципа на лазерна флуоресценция

- Количествена светлинна флуоресценция – *QrayCam Pro*;

- Лазерна флуоресценция – *DiagnoDent Pen*;

3. Диагностика на базата на луминисценцията:

- Фототермична радиометрия и модулирана луминисценция – *Canary system*;

- Биолуминисцентна технология за оценка на активността на лезията – *CALCIVIS*;

4. Диагностика на базата на електричен ток:

- Измерване на електрическото съпротивление;
- Измерване на електрическата проводимост;

5. Ултразвукова диагностика

6. Други

- Оптична кохерентна томография;
- Конусно-лъчева томография;
- Поляризирана Раманова спектроскопия;
- Инфрачервена флуоресценция.

В клиничната практика най-голямо приложение намират т.нар. оптични методи, които използват видима светлина или такава с близост до инфрачервения спектър [207]. Специфичните оптични промени възникват поради взаимодействието на светлината със зъбната повърхност. Както бе посочено по-горе, загубата на минерално съдържимо води до повишаването на порьозността на емайла в зоната на лезията. По-голямото разсейване на светлината, в резултат на структурните промени, води до появата на т.нар. бяло петно, което има специфични оптични характеристики [362].

Лазерната флуоресценция (ЛФ) е технология, която се основава на разликата в излъчваната флуоресценция между интактен и деминерализиран емайл. Уредът *DiagnoDent Pen (KaVo, Biberach, Germany)* излъчва светлина с дължина на вълната 655 nm, която се поглъща от зъбните структури [264, 401, 405]. Излъчената от тях инфрачервена флуоресценция се улавя от диоден крайник на апарата и се представя като числена стойност, изписана на дисплей. Дълбочината на лезията е в правопрпорционална зависимост от интензитета на флуоресценцията, който зависи от степента на бактериалната контаминация [109, 139]. Малкият размер на апарата го прави удобен за ежедневната клинична практика. Съществуват две форми на диодния крайник – за

оклузални/гладки и за апроксимални повърхности. Достоверността на метода е потвърдена в редица *in vitro* и *in vivo* проучвания [184, 185, 243, 244]. Техниката се отличава с висока специфичност и чувствителност, особено за оклузални кариозни лезии (табл. 5) [185, 211].

Таблица 5. Обобщено описание на характеристиките на DiagnoDent.

Повърхности, които могат да бъдат изследвани с апарата	Оклузална	Апроксимална	Гладки пов. (букална/лингвална)	Кариес на корена
	✓	✓	✓	-
Тип лезии, които могат да се изследват с апарата	Първичен кариес на короната	Вторичен кариес на короната	Първичен кариес на корена	Вторичен кариес на корена
	✓	-	-	-
Обхват на лезиите	Емайлови лезии		Дентинови лезии	
	✓		✓	
Чувствителност на метода	Кариес в емайла: 0.68–0.96 Кариес в дентина: 0.67–0.81			
Специфичност на метода	Кариес в емайла: 0.60–0.85 Кариес в дентина: 0.79–0.87			
Съзъбие, при което може да се използва	Млечно съзъбие		Постоянно съзъбие	
	✓		✓	
Предимства/недостатъци	<u>Предимства:</u> 1. Диагностика на кариеса без йонизиращо лъчение; 2. Мониториране на кариозния процес; 3. Подпомага клиничните решения на лекаря по дентална медицина;			
	<u>Недостатъци:</u> 1. Измерва само стойности, без да прави изображения; 2. Не открива кавитация на лезията; 3. Накрайникът за апроксималните зони в някои случаи е неподходящ поради по-тесни пространства; 4. Апроксималният накрайник не е еластичен и може да се счупи по време на изследването.			
Време, за което се извършва изследването	Оклузално: 10-40 секунди; Апроксимално: 20 секунди от вестибуларно и лингвално; Калибриране на уреда преди първото измерване: 15 секунди.			

Най-вероятните причини за намалената флуоресценция на белите кариозни петна са: отражението на светлината в кариозната лезия, което е по-силно в сравнение със здравия емайла, пътят на светлината е по-къс, абсорбцията на единица площ е много по-малка, а флуоресценцията по-силна; отражението на светлината действа като бариера и пречи на достигането ѝ до подлежащия здрав емайл.

Недостатъци при използването на *DiagnoDent Pen*, са нуждата от често калибриране на апарата и придвижването на върха му в различни посоки, за да се отчете най-високата стойност на лазерна флуоресценция. Тези манипулации повишават риска от възникване на грешки [372].

Друг много надежден метод за ранна диагностика на емайлови кариозни лезии и мониториране на ефекта от реминерализиращата терапия, е **количествената светлинна флуоресценция (КСФ)** [1, 150, 300, 354]. Когато зъбните структури се осветят със синя светлина с дължина на вълната 405 nm, интактният дентин флуоресцира в жълто-зелен цвят, поради наличието на т.нар. флуорофори [101]. Това може да се визуализира чрез използването на жълт високочестотен филтър ($\lambda \geq 540$ nm) [377]. Преминаването на светлината през кариозната лезия е свързано с по-голямото ѝ разсейване в сравнение с това от заобикалящата здрава структура. По този начин лезията се визуализира като тъмно петно върху светлозелен фон, а при наличие на бактерии, фотопорфирините флуоресцират в оранжево-червено (червена флуоресценция) [221, 228]. Резултатите от изследването с КСФ са съпоставими с получените при трансверзионна микрорадиография – метод, определян като „златен стандарт“ в изследването на минералния състав на зъбните структури [34, 35, 160]. На таблица 6 е представена обобщена характеристика на КСФ (табл.6).

Таблица 6. Обобщена характеристика на КСФ.

Повърхности, които могат да бъдат изследвани с апарата	Оклузална	Апрокисмална	Гладки пов. (букална/лингвална)	Кариес на корена
	✓	✓	✓	✓
Тип лезии, които могат да се изследват с апарата	Първичен кариес (на короната)	Вторичен кариес (на короната)	Първичен кариес на корена	Вторичен кариес на корена
	✓	✓	✓	✓
Обхват на лезиите	Емайлови лезии		Дентинови лезии	
	✓		✓	
Чувствителност на метода	В литературата се срещат стойности между 0.64-0.94, те варират в зависимост от повърхностите, типа лезия и дълбочината на лезията.			
Специфичност на метода	В литературата се срещат стойности между 0.64 и 1.00, те варират в зависимост от повърхностите, типа лезия и дълбочината на лезията.			
Съзъбие, при което може да се използва	Млечно съзъбие		Постоянно съзъбие	
	✓		✓	
Предимства/недостатъци	Предимства: Начинът на работа с уредите се усвоява лесно от оператора, улеснява комуникацията с пациентите, спестява време, може да се направи количествен анализ на лезиите, мониторинг на лезиите и проследяване на ефекта от лечението.			
	Недостатъци: Чувствителност спрямо околната светлина, трудно позициониране на камерата в аналогична позиция спрямо първата снимка.			
Време, за което се извършва изследването	За всички зъбни повърхности: - 1-2 минути (за заснемането на изображенията) - Около 5 минути за количествения анализ със специализирания софтуер.			

Апаратът, който използва КСФ (*QrayCam Pro, Inspektor Research Systems, Netherlands*), представлява камера с макрообектив 60 mm. Тя е снабдена с филтри, които са необходими за създаването на две последователни изображения – едно с бяла и друго – със синя светлина [219]. Анализът на получените резултати се прави чрез специално създаден софтуер (*QrayCam Pro full clinical software*).

Таблица 7. Количествени параметри, получени при КСФ изследване.

Име	Символ	Мерна единица	Описание
Делта F	ΔF	%	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура. Определя дълбочината на лезията.
Делта Q	ΔQ	% ρx^2	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата тъкан, умножено по площта на лезията. Определя обема на лезията.
Площ на лезията	$A_{\Delta F}$	ρx^2	Площ с ΔF равно или по-малко от специфичната прагова стойност на ΔF (по подразбиране – 5%).
Делта R	ΔR	%	Увеличеното процентно съотношение на червена и зелена компонентна на флуоресценцията, отнесено към съотношението в здравата структура. Свързва се с присъствието на порфирини и индиректно показва бактериалната активност.
Площ с червена флуоресценция	$A_{\Delta R}$	ρx^2	Площ с ΔR равна или по-голяма от специфичната прагова стойност на ΔR .
Опростена оценка на плаката	SPSTM (Simple plaque scoreTM)	-	Стойност от 0 (липса на матурирана плака) до 5 (голямо количество матурирана плака).
Двунюансна оценка на плаката	TTPSTM (Two-Tone Plaque ScoreTM)	%	Процент от зъбната повърхност, покрита с матурирана (тъмно-синьо) и нематурирана (розово-синьо) плака.

Снимките служат за документиране и анализ на клиничния случай [297]. На тези изображения деминерализираните зони са представени като тъмни петна, а загубата на флуоресценция е следствие от намаляването на минералното съдържимо [202].

Горепосочените параметри (ΔF , ΔQ , $A_{\Delta F}$, ΔR , $A_{\Delta R}$, $SPSTM$, $TTPSTM$) се изчисляват за предварително зададени области от изследваната зъбна повърхност. Изчисляването на параметрите подпомага откриването и диференцирането на емайловите лезии в много ранен етап на развитие. Снимките се съхраняват и се използват за проследяването на лезиите във времето, а също и за обучение и мотивация на пациентите [382].

Клиничното приложение на КСФ включва:

- **Оценка на орално-хигиенния статус и мотивация на пациентите:** лесно се демонстрира наличието на остатъчна плака, която флуоресцира в оранжево-червено. Избягва се използването на оцветяващи агенти, което се възприема много добре от пациентите [162].
- **При ортодонтско лечение:** за регистриране на началното състояние на съзъбието преди поставянето на брекетите и мониториране на орално-хигиенния статус, както и появата на начални емайлови кариозни лезии по време на лечението [62].
- **Ранна диагностика на кариозни лезии и наблюдение на ефекта от лечението им:** възможно е проследяване на прогресията, стационарирането или дори обратното развитие на кариозните лезии в емайла, според което може да бъде адаптиран лечебно-профилактичния план [214].
- **Контролирана екскавация на кариозната лезия:** проследява се наличието на инфектирана зъбна структура, която флуоресцира в оранжево-червен цвят [213].

- **Установяване на риск от развитие на вторичен кариес:** порфирините имат тенденцията да се натрупват по дефектни ръбове на obturации и силанти, и чрез КСФ може да се наблюдава червена флуоресценция в тези зони [45, 145].
- **Апроксимален кариес:** съществуват твърдения, че КСФ може да подобри възможностите за ранна диагностика на апроксимални кариозни лезии [220].

Недостатък на метода е, че точността на резултатите може да бъде повлияна от допълнителни фактори като: екзогенни оцветявания [329], време на подсушаване [41, 298], ангулация при заснемането с камерата [44]. Въпреки че КСФ има висока чувствителност в сравнение с други методи за ранна диагностика на кариеса [141], софтуерният анализ отчита всяка промяна в стойността на пикселите като деминерализация. Това е причина и за относително по-ниската специфичност на метода. За получаването на по-точни клинични резултати е препоръчително КСФ да се комбинира с визуален метод с висока специфичност, например ICDAS [140].

4. СИСТЕМИ ЗА РЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ НА ЕМАЙЛА

В литературата съществува единодушно мнение, че подходът в управлението на кариозния процес трябва да бъде насочен към максимално запазване на зъбни структури и obturiranje само при необходимост [191]. Все повече се използва Международната система за откриване и оценка на кариеса (ICDAS), в която некавитираните емайлови лезии (ICDAS кодове 1 и 2) също са включени. От една страна, включването на некавитираните кариозни лезии увеличава броя на хората, диагностицирани със зъбен кариес, но от друга, насърчава развитието на вторична профилактика чрез

неоперативно превантивно лечение и използването на реминерализиращи средства [21, 293].

Безспорно, откриването и въвеждането на флуоридите в кариесната профилактика, е едно от най-значимите събития в денталната медицина през 20-ти век [363]. Намаляването на броя на регистрираните кариозни заболявания в развитите страни се дължи предимно на широката употреба на флуорид-съдържащи продукти [135]. Те представляват златен стандарт в превенцията на зъбния кариес [59, 252, 337]. Въпреки това, епидемиологичните данни от последните години показват, че има повишаване честотата на кариеса в някои страни, независимо от редовната употреба на флуорид-съдържащи паста за зъби [113]. Това се обяснява с повишаването приема на храни, богати на прости въглехидрати, което затруднява действието на флуора.

При физиологични условия флуоридите и буферният капацитет на слюнката са ефективни, за да настъпи реминерализация на началните емайлови лезии. При високо кариесогенен потенциал на оралната среда, както и при възрастни пациенти и страдащите от ксеростомия, тези механизми не са достатъчни. Решение на този проблем би било повишаването на флуорната концентрация в продуктите за орална хигиена. *Wierichs u Meyer-Lueckel* установяват, че флуорна концентрация 5000 ppm в пастите за зъби ще бъде много по-ефективна при реминерализацията на кариозни лезии, отколкото традиционните 1000-1500 ppm [26, 390]. Този подход не е намерил приложение, защото повишава риска от развитие на зъбна флуороза при децата. Поради това СЗО препоръчва да се оцени общият прием на флуориди от населението, преди те да се прилагат за профилактика на кариеса [18, 51].

Друг важен проблем при локалното приложение на високи концентрации флуорид е повишаването честотата на т.нар. окултен кариес („флуориден синдром“). Той засяга всички възрастови групи и се дължи на

реминерализация в повърхностната зона на лезията, без да се повлияват по-дълбоките ѝ слоеве [53].

Реминерализацията чрез флуорни препарати води до образуването на флуорапатит [216, 279, 288]. Известно е, че съединенията на флуора трудно могат да постигнат правилно подредени минерални кристали върху емайловата повърхност при физиологични условия, което нарушава структурната цялост на реминерализирания слой [149]. Тези недостатъци на флуорните агенти налагат създаването на нови реминерализиращи системи, които да допълнят действието им [288].

Според *Walsh*, идеалният реминерализиращ агент трябва да отговаря на следните изисквания [383, 408]:

- Да доставя калциеви и фосфатни йони до подповърхностната емайлова лезия;
- Да не намалява/губи функциите си при кисело рН;
- Да възпрепятства процеса на деминерализация;
- Да стимулира реминерализиращите свойства на слюнката;
- Да функционира при пациенти с ксеростомия;
- Да не предизвиква образуването и натрупването на зъбен камък;
- Да има по-добри качества от флуорните съединения, използвани за реминерализация.

В резултат на по-задълбочено познание за процеса на реминерализация се развиха нови технологии, стимулиращи емайловата реминерализация. Те съответстват на идеологията за минимално инвазивна дентална медицина и т.нар. направлявана емайлова регенерация (NER) [288]. Някои от материалите вече се прилагат клинично, докато други са на различен етап от експерименталното си развитие (табл. 8).

Таблица 8. Нефлуоридни системи за реминерализация на емайла и някои търговски продукти.

Технология	Търговски продукт
<p align="center">БИОМИМЕТИЧНИ СИСТЕМИ</p> <p>1. Дентин-фосфопротеин 8DSS</p> <p>2. Самоорганизиращ се пептид P11-4</p> <p>3. Амелогенин, богат на левцин</p> <p>4. Поли(амидоамин) дендримери</p> <p>5. Електрически подпомогната реминерализация</p> <p>6. Нанохидроксилапатит</p>	<p>Не е наличен</p> <p>Curodont Repair / Curodont Protect</p> <p>Не е наличен</p> <p>Не е наличен</p> <p>Не е наличен</p> <p>Аpagard toothpaste / Desensin oral rinse</p>
<p align="center">РЕМИНЕРАЛИЗИРАЩИ СИСТЕМИ, ДОПЪЛВАЩИ ДЕЙСТВИЕТО НА ФЛУОРИДИТЕ</p> <p>1. Калциево-фосфатни системи</p> <p>1.1. Стабилизирани калциеви фосфати</p> <ul style="list-style-type: none"> - Казеин фосфопептид-аморфен калциев фосфат <p>1.2. Кристалинни калциеви фосфати</p> <ul style="list-style-type: none"> - функционализиран трикалциев фосфат - калциево-натриев фосфосиликат (биоактивно стъкло) <p>(NovaMin™ technology)</p> <p>1.3. Нестабилizирани калциеви фосфати</p> <ul style="list-style-type: none"> - Аморфен калциев фосфат <p>(Enamelon™ technology)</p> <p>2. Полифосфатни системи</p> <ul style="list-style-type: none"> - натриев триметафосфат - калциев глицерофосфат - натриев хексаметафосфат <p>3. Природни средства</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Galla chinensis</i>, <i>Gumma arabica</i> - Хесперидин 	<p>Tooth Mousse/MI Paste cremes</p> <p>Recaldent/Trident</p> <p>ClinPro - паста за зъби</p> <p>Oravive - паста за зъби</p> <p>Enamelon – паста за зъби</p> <p>Oral-B Pro Expert – паста за зъби</p> <p>Не е наличен</p>

5. РЕМИНЕРАЛИЗИРАЩИ СИСТЕМИ, ДОПЪЛВАЩИ ДЕЙСТВИЕТО НА ФЛУОРИДИТЕ

Едни от най-добре проучените и представени на пазара системи, допълващи действието на флуоридите са: казеин фосфопептид-аморфен калциев фосфат (СРР-АСР), трикалциев фосфат, биоактивно стъкло и полифосфатите [2].

5.1. Казеин фосфопептид-аморфен калциев фосфат (СРР-АСР)

Казеините са хетерогенна група протеини с млечен произход, предимно представени в α -1 и -2 и β – форма. Казеин-фосфопептидите (СРР) са фосфорилирани казеинови пептиди. СРР имат възможността да свързват и стабилизират аморфния калциев фосфат (АСР) в разтвор [310]. СРР-АСР наноконплексите се разтварят лесно в слюнката, като по този начин се създава дифузионен градиент, който им позволява да се свързват към зъбния биофилм и зъбната повърхност. СРР-АСР действа като резервоар на биоактивни калциеви и фосфатни йони, които улесняват реминерализацията [310]. СРР-АСР е един от най-задълбочено изследваните нефлуоридни реминерализиращи продукти, макар че в литературата данните за ефективността му са противоречиви. Редица проучвания установяват, че СРР-АСР притежава по-добър реминерализиращ и противокариесен ефект, в сравнение с други флуор-съдържащи препарати [52, 155, 170, 201, 223, 238, 268, 306, 316]. От друга страна, има проучвания, чиито резултати противоречат на горепосочените [55, 65, 180, 345, 346, 347]. Те не установяват по-добър реминерализиращ ефект на СРР-АСР в сравнение с флуорните съединения. Това може да се обясни с разликата в механизмите на действие на СРР-АСР съдържащи продукти и флуорните агенти. СРР-АСР подпомага реминерализацията на подповърхностните лезии, докато флуоридите повлияват предимно повърхностната зона на лезията [338]. Реминерализирането на

некавитираната емайлова лезия в дълбочина води до подобряване на механичните качества на емайла и повишаване устойчивостта при киселинно въздействие. Освен това, способността на CPP-ACP да създава високи концентрации на стабилизирани Ca^{2+} и PO_4^{3-} е от изключителна важност при високо кариесогенна среда (пациенти с ксеростомия; повече от 6 въглехидратни приема дневно). В тези случаи флуоридите и буферния капацитет на слюнката са недостатъчни за реминерализирането или стационарирането на кариозните лезии. За изясняването на противоречивите заключения от литературните данни, е необходимо провеждането на допълнителни, продължителни и независими проучвания, които да обхващат високорисковите групи [151].

5.2. Калциево-натриев фосфосиликат (биоактивно стъкло)

NovaminTM представлява неорганичен аморфен калциево-натриев фосфосиликат и е представител на клас материали, известни като биоактивни стъкла [356, 376]. Натриевите йони на биоактивното стъкло реагират с водородните йони от слюнката, като по този начин се индуцира освобождаването на калциеви и фосфатни йони от системата. Наблюдава се локално, преходно повишаване на рН на средата по време на първоначалното излагане на материала на действието на слюнката. Алкализирането на средата подпомага преципитацията на калциеви и фосфатни йони като се формира калциево-фосфатен слой върху зъбната повърхност. На по-късен етап настъпва кристализиране в хидроксикарбонатапатитен слой, чиито химичен състав и структура са подобни на емайловия апатит [169, 200]. Данните за ефективността (*in vitro* и *in situ*) на този агент са оскъдни и противоречиви [97], липсват и доказателства за реминерализация му ефект в клинични проучвания.

5.3. Трикалциев фосфат (*f*-ТСР)

Трикалциевият фосфат представлява хибриден материал, който се получава от реакцията на β -трикалциев фосфат (β -ТСР) и натриев лаурил сулфат или фумарова киселина [205]. Съчетаването на тези съединения води до бавното освобождаване на „функционален“ калций и „свободен“ фосфат, необходими при реминерализацията [296, 314]. В проучване на *Reynolds* и кол. се установява, че ТСР може да осъществи по-добра повърхностна и подповърхностна реминерализация на емайла в сравнение с 5000 ppm флуорен препарат и CPP-ACP [314]. От друга страна, *Walsh* и кол. установяват, че CPP-ACP има по-добър ефект в реминерализирането на ранните емайлови лезии в сравнение с функционалния трикалциев фосфат [386]. Всички публикувани проучвания за β -ТСР са проведени *in vitro* и дават обещаващи резултати, но са необходими още изследвания, за да се установи ефикасността на този реминерализиращ агент в клинични условия.

5.4. Полифосфати

Към тази група се отнасят съединения като натриев триметафосфат (НТМФ), калциев глицерофосфат или калциев хексаметафосфат [95, 358, 406]. От тях натриевият триметафосфат е най-ефективният противокариесен агент, който инхибира деминерализацията и стимулира реминерализацията [147, 360].

Натриевият триметафосфат ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) се свързва с фосфатните групи по емайловата повърхност, където остава адсорбиран за дълго време. По този начин се образува предпазен слой, който забавя йонната дифузия при повишена киселинност на средата [260]. Способността на НТМФ да ограничава минералното разтваряне, дори при ниски флуоридни концентрации, е доказана в редица *in vitro* и *in situ* проучвания [99, 125, 359, 360]. Изследване на *Takeshita* и кол. разкрива, че добавянето на НТМФ към

паста за зъби с ниска флуоридна концентрация води до реминерализиращ ефект, подобен на този при използването на флуорен лак (1100 ppm). *Danelon* и кол. [98] и *Manarelli* и кол. [250] доказват, че комбинирането на НТМФ с конвенционални паста за зъби и флуорни лакове води до значително подобряване на реминерализацията на изкуствените емайлови лезии. Приложението на полифосфатите има задоволителен реминерализиращ ефект върху емайла, но са необходими допълнителни клинични проучвания, за да се установи дали те повлияват обратното развитие на некавитираните емайлови лезии.

5.5. Природни продукти, повлияващи реминерализацията на емайла

Приложението на продукти с природен произход в реминерализацията на емайла е допълнение към всички гореспоменати системи. Между тях основно място заема *Galla chinensis*, растително листно образувание, възникнало под влияние на паразитни листни въшки. Установено е, че то намалява деминерализацията, потенцира реминерализацията и повишава ефекта на флуоридите [83, 84, 183]. Механизмът на действие не е напълно изяснен, но се предполага, че полифенолите, които се съдържат в образуванието, стабилизират остатъците от органичната матрица на емайла, като по този начин блокират йонните потоци и забавят деминерализацията [182]. Съществуват твърдения, че полифенолите изпълняват ролята на преносители на Ca^{2+} към тялото на лезията [85]. Хесперидинът – флавоноид от цитрусов произход и *Guma arabicca* – сок от *Acacia*, са други натурални продукти, които биха могли да потенцират реминерализацията на емайла [173, 276].

Обществото би приело положително продуктите с естествен произход в сравнение с флуор-съдържащите препарати, но тяхното химично

дефиниране и стандартизиране е изключително важно преди прилагането им в клиничната практика.

6. БИОМИМЕТИЧНА РЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ

Резултатите при използването на горепосочените реминерализиращи агенти са задоволителни, но те не могат да стимулират формирането на организирани апатитни кристали [230, 400]. Това определя необходимостта от създаването на средства за реминерализация, които да постигнат организацията и микроархитектурата на минералните кристали, максимално доближаващи се до тези на естествения емайл [63, 122, 399].

Биомиметиката е наука, която се фокусира върху адаптирането на знанията за природни процеси в съвременни технологии за нуждите на човешкото общество [60, 379]. Установено е, че разликата във физикомеханичните и химичните свойства на възстановителните материали, спрямо тези на естествените зъбните структури, е една от основните причини за неуспехите при денталните възстановявания [138]. Ето защо, изследователите насочват усилията си в създаването на синтетичен, но подобен на емайла материал [324]. Биомиметичната минерализация е методология, която цели пресъздаване на естествения процес на минерализация [79].

Robinson и кол. откриват, че сферични минерални частици с диаметър 50 nm, подредени във вериги, участват при формирането на емайла [318]. Съществува схващане, че тези наночастици са съставени от аморфен калциев фосфат и протеини, свързани с биоминерализацията [93, 166]. Един от тези протеини е амелогенинът, който има водеща роля в регулацията на биоминерализацията и кристалната организация в емайла. Последващото лизиране на белтъците води до сливането на АСР-наночастиците и трансформирането на минералната фаза в хидроксилapatит [266]. Изучаването на структурата и функцията на амелогенина е от съществено

значение за развитието на биомиметичния подход в реминерализацията на емайла. Откриването на негови аналози, способни да стабилизират и направляват фазовата трансформация на АСР, е важна стъпка в създаването на съвременни биомиметични реминерализиращи системи [344, 374].

6.1. Биологични основи на биомиметичната реминерализация

В живите организми емайлт се изгражда преди зъбния пробив като безклетъчна структура, която няма възможност за самостоятелна регенерация [163, 196, 235]. Зъбният емайл е нехомогенна, високоминерализирана, анизотропна минерална структура. Зрелият зъбен емайл е ацелуларен, с над 95% минерален състав. Минералната му фаза има апатитна структура (калциев хидроксилапатит) с включени карбонатни и хидрогенфосфатни йони, натрий, магнезий, флуор или други микро- и макроелементи. Останалите около 5% от състава му са вода, малки количества протеини и липиди. Емайлт съдържа структури от различни йерархически нива на организация – от нанометричната до микрометричната скала [279].

На **нанометрично ниво**, основните елементи на зрелия зъбен емайл са високоорганизирани хидроксилапатитни кристали, коаксиално разположени по *c*-оста на емайловата призма, с размери 50-70 nm ширина и 20-35 nm дебелина [267]. Плътноста на емайловите кристали се повишава от емайл-дентиновата граница (ЕДГ) към външната емайлова повърхност [319].

На **микрометрично ниво** кристалитите са групирани в по-сложни структури, наречени емайлови призми. Те са основната хистологична единица на зрелия емайл. Между тях се намират интерпризматични пространства и призмени граници. Размерът на призмата е около 5 μm в диаметър и е изградена от нанокристали. Всяка емайлова призма започва под известен ъгъл от ЕДГ. Скоро след това тя се извива спираловидно. Този

S-образен ход достига до границата между вътрешната една трета и външните две трети от дебелината на емайла и осигурява якостта му, като го предпазва от разцепване под действие на аксиалните сили при дъвкателния процес [14]. От това ниво призмата се насочва приблизително под прав ъгъл към съответната зъбна повърхност, достигайки на няколко микрона от нея [324]. Поради различното подреждане на призмите твърдостта и модулът на еластичност постепенно намаляват от зъбната повърхност към ЕДГ. Установено е, че механичните качества на букалния емайл се различават от тези на лингвалния [94].

Химичният състав на емайла също играе важна роля в определянето на механичните му качества. Някои автори твърдят, че те се повлияват от съдържанието на магнезий, натрий и карбонатни йони [393]. *Xie* и кол. установяват, че по-високото протеиново съдържание в интерпризматичните пространства е причина за по-ниските стойности на нанотвърдост и модул на еластичност в тези зони, отколкото в емайловите призми [149]. Високото съдържание на хидроксилапатит и прецизното подреждане на призмите, определят емайла като биоструктура с изключителна здравина и якост [391].

6.2. Протеин-медиран подход в реминерализацията на емайла

В инициалната фаза на амелогенезата емайловият матрикс съдържа 60-70% вода, 20-30% протеини и 15-20% минерални йони [320, 321]. Три уникални матриксни протеина, наречени емайлови протеини, се свързват с развитието на емайла – амелогенин, амелобластин и енамелин [49]. Смята се, че те допринасят за трите основни функции на развиващия се емайлов матрикс:

- Зародишообразуването на емайлов апатит;
- Кристален растеж на емайловия апатит;

- Подреждане на апатитните кристали в определен ред по време на зародишообразуването [267, 281].

Амелогенинът съставя повече от 90% от екстрацелуларния органичен матрикс. Пептидът се отличава с няколко важни характеристики:

- **Структурна приспособимост:** последните проучвания разкриват, че макромолекулата на амелогенина е с амфотерен характер и проявява тенденция да променя пространствената си структура в зависимост от условията на околната среда [104, 142, 350].
- **Самоорганизиране на амелогенина:** под влияние на различни фактори *in vitro* амелогенинът може да се самоорганизира в четвъртични структури – наносфери, нановериги, олигомери, микро- и нановлакна [124, 257]. Този процес зависи от рН на средата, от концентрацията на протеини, температура и йонната сила, но може да се повлияе и от присъствието на протеази, други емайлови протеини, калциеви и фосфатни йони [227, 398].
- **Взаимодействие на амелогенина с други емайлови протеини:** за правилното протичане на амелогенезата от голямо значение е присъствието на другите два основни емайлови протеина – енамелин и амелобластин. Матриксните metalloпротеинази (ММР20) и каликреин 4 (КЛК4) са протеини, които също имат важна роля в амелогенезата като подпомагат посттранслационните процеси на матриксните протеини [179, 241, 270].

Ключовата роля на амелогенина и другите протеини дава основание на изследователите да използват естествени пептиди за контролираните процеси на реминерализация [123]. Този експериментален подход среща трудности, свързани с извличането, охарактеризирането и съхраняването на естествения протеин. Ето защо, създаването на техни аналози е първата стъпка към възстановяването на увредения емайл чрез протеин-контролирана биоминерализация [281].

Проучването на контролираната биомиметична реминерализация изисква моделни изследвания, при които се създават възпроизводими експериментални условия и прецизен модел на изкуствен емайлов кариес. Това е един от основните етапи при апробирането на новосинтезирани реминерализиращи системи [403].

7. МОДЕЛ НА ИЗКУСТВЕН КАРИЕС

Моделите на изкуствен кариес, които се използват в *in vitro* проучванията, могат да се разделят на две основни групи: **биофилмови и химични модели** за деминерализация. Биофилмовите модели пресъздават в по-голяма степен естествения процес на възникване и развитие на кариозната лезия. Основен техен недостък е, че възпроизводимостта и повтаряемостта на експеримента се затрудняват, особено при използването на хетерогенен биофилм [403]. В по-голямата част от проучванията се прилагат химични модели за създаването на изкуствен емайлов кариес [67, 203, 217, 332]. Подповърхностната лезия се образува от деминерализиращ агент с постоянно рН, чиято оптимална стойност варира между 4.4-5 в повечето проучвания [11, 403].

Този модел се използва от много изследователи, защото е ефективен, спестява време и улеснява експерименталната постановка, когато се тества реминерализиращият ефект на дадена система. Освен това, степента на деминерализация може да се контролира чрез промяна в условията на средата като рН, температура и продължителност на въздействието на разтвора върху образеца [256]. При повечето химически модели на деминерализация може да се получи по-голяма загуба на минерално съдържимо, отколкото при естествения емайлов кариес [335]. Трябва да се подчертае, че експерименталният модел на деминерализация не пресъздава сложния процес на възникване и развитие на естествената емайлова кариозна лезия [348].

Според химичния си състав, деминерализиращите системи се разделят на буфери, разтвори и гелове.

Разтворите, които се използват за създаването на изкуствени кариозни лезии, съдържат органични киселини, калциеви и фосфатни соли, и малки количества вещества, които запазват повърхностния емайлов слой. [302]. Млечната и оцетната киселини са основните агенти, които се използват за създаването на изкуствен кариес в редица лабораторни проучвания [9, 11, 38, 129]. Съществуват твърдения, че млечната киселина преобладава при активните кариозни лезии, докато оцетната по-често се свързва с неактивните, хронични [175].

Буферите имат дефинирана степен на насищане по отношение на хидроксилапатита. Подобно на разтворите, те съдържат органични киселини, калциеви и фосфатни соли, но и флуорни съединения, които предпазват от кавитиране повърхностния емайлов слой [29].

В някои проучвания за създаването на изкуствена кариозна лезия са използвани **гелни системи**, включващи желатин, хидроксиетилцелулоза, карбоксиметилцелулоза или метилцелулоза [246, 269, 335]. Количеството и вискозитетът на гела влияят върху времето на минерално насищане в системата. Карбоксиметилцелулозната съставка на лактатния гел създава дифузионна бариера върху емайловата повърхност. По този начин химичните процеси са по-бавни, отколкото при деминерализиращите разтвори [269]. Карбоксиметилцелулозата може да взаимодейства с калциевите йони, което също забавя процесите на разтваряне [246].

Присъствието на инхибитори на деминерализацията, известни още като **съединения, предпазващи повърхностния слой**, подпомагат създаването на типична подповърхностна лезия. Те забавят скоростта на деминерализационния процес, което води до съхраняване на структурната цялост на емайла [8]. Едно от тези съединения – метилхидроксидифосфонатът (МХДФ) значително потиска разтварянето на

хидроксилапатита дори при ниски концентрации. По този начин повърхността на емайловата лезия се запазва интактна [70, 73, 127].

Флуорните йони също допринасят за запазването на външния слой като взаимодействат с частично деминерализирания емайл, при което се образува киселинно-устойчив флуор-съдържащ апатит [10, 13, 56, 367].

Концентрацията на калциеви и фосфатни йони в химическите модели е от съществено значение за създаването на подповърхностна кариозна лезия. Ниските концентрации на тези йони съхраняват повърхността на емайла, докато разтвори, в които те липсват, могат да предизвикат ерозирането му [12, 100, 368].

В някои проучвания се включва и термоциклиране, като по този начин се наподобява стареенето на изследваните образци [39, 277].

Създаването на модел на изкуствен кариес е един от основните етапи при обективизирането на реминерализация потенциал на биомиметичните системи. Анизотропната структура на емайла [305] определя разликите във физикомеханичните и химичните характеристики на изкуствените лезии [269]. Поради тази причина е важно образуваните моделни емайлови лезии да бъдат детайлно охарактеризирани при всеки един експеримент [403].

8. БИОМИМЕТИЧНИ РЕМИНЕРАЛИЗИРАЩИ СИСТЕМИ

Възпроизвеждането на микроархитектурата на емайла чрез новосинтезирани вещества изисква задълбочено изучаване на взаимодействието на компонентите на екстрацелуларния матрикс (амелогенин, енамелин и амелобластин) както помежду им, така и с формиращата се минерална фаза [349]. Тази динамична система предоставя богата информация за основните принципи на протеин-медираната биоминерализация. Тя може да бъде приложена в материалознанието за

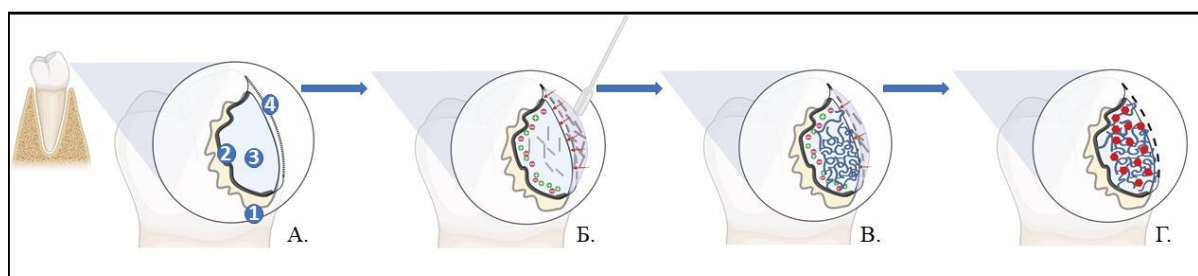
разработването на биомиметични агенти, които да се включат в състава на възстановителните материали [218, 326].

8.1. Биомиметични агенти, базирани на пептиди

Поради трудното извличане и пречистване на естествените протени, изследователите се насочват към създаването на протеинови аналози. Пептид с множество повтаряеми аминокиселинни последователности от Аспартат-Серин-Серин (DSS), аналогично на подредбата им в дентиновия фосфопротеин (DPP), има висок афинитет към калциево-фосфатните съединения и стимулира образуването на хидроксилапатитни кристали [90, 177, 178]. Аспарагин-серин-серин пептидът (3NSS), който е дериват на DSS, е създаден чрез заместването на -COOH групата в аспартата, с -CONH₂ група. Установено е, че при използването на 3NSS, степента на възстановяване на увредения емайл е значително по-висока в сравнение с DSS-пептида. Предполага се, че тази разлика се дължи на различното йонно привличане на -COOH и -CONH₂ групите [89, 91]. *Li* и кол. създават амфотерен олигопептид, който се състои от дериват на стеариновата киселина и хидрофилния С-край на амелогенина. При това изследване е установено формирането на апатитни кристали след третирането на ецваната емайлова повърхност с пептида [232]. *Chu* и кол. провеждат проучване, в което използват създаден от тях пептид, подобен на амелогенина. Той е съставен само от функционалните аминокиселинни остатъци на N-края и хидрофилния С-край на свински амелогенин. Установено е, че приложението на определени концентрации от този пептид върху начални кариозни лезии, води до повишаване степента на реминерализация. Компютърната микротомография показва промяна в минералната плътност на емайла. Счита се, че пептидът служи като регулиращ фактор в подреждането на кристалите [87].

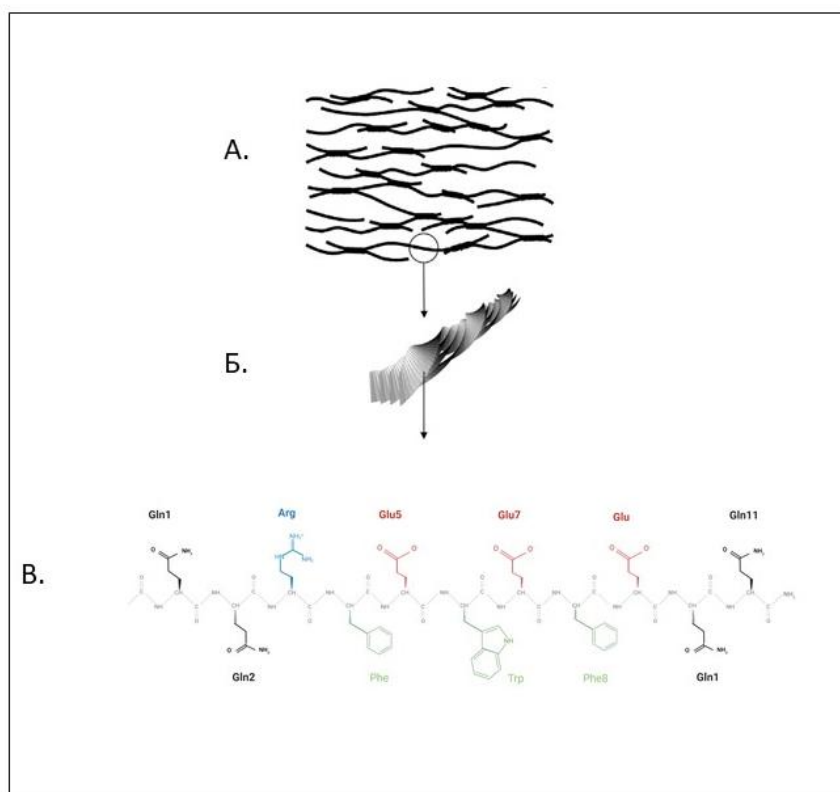
Процесът на самоорганизация на молекулите е задълбочено проучен, което дава възможност синтетични протеини да участват в регенеративната терапия на твърди и меки тъкани в човешкото тяло [259].

Опит да се промени репаративният подход при лечение на зъбния кариес, е представеният от *Kirhkam* и кол. през 2007 година **самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄** [217]. Протеинът се състои от 11 аминокиселини (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH₂) и има способността да се самоорганизира, подобно на амелогенина, в тялото на подповърхностна емайлова лезия. Той се трансформира в триизмерна мрежа, чиито характеристики наподобяват емайловия матрикс [36]. Под влияние на фактори от околната среда като рН, йонна сила, температура, за 24 часа пептидът претърпява едномерно самоорганизиране и формира микрометрични наноленти. Те се трансформират във фибрили, след което във влакна, преминаващи от край до край в мрежата [31, 272] (фиг. 2). Този процес на самосглобяване се дължи на междумолекулните водородни връзки от основната пептидна верига и други допълнителни взаимодействия между специфичните странични вериги [30, 209].



Фиг. 2. А. Хистологични зони на подповърхностната емайлова лезия: 1) транслуцентна зона; 2) тъмна зона; 3) тяло на лезията; 4) повърхностна зона. Б. Мономерната форма на P₁₁₋₄ дифундира в тялото на лезията през порите на повърхностната зона. В. Пептидът претърпява самоорганизация. Г. Зародишообразуване и формиране на ХАП кристали *de novo* (червени шестоъгълници).

P₁₁₋₄ пептидът е мономерен в разтвор с алкално рН, но може да се трансформира във фибрили при повишаване на киселинността. Ароматните аминокиселини фенилаланин, триптофан, фенилаланин на съответните позиции 4, 6 и 8, са свързани с трансформирането на нанолентите във влакна, поради възникването на π - π взаимодействия. Крайните глутаминови остатъци водят до образуването на водородни връзки и хидрофобни взаимодействия. Организирането на антипаралелни β -листове се дължи на положителния заряд на аргинина. При по-високо рН, остатъците от глутамат са отрицателно заредени и образуването на β -листове е възпрепятствано поради електростатично отблъскване (фиг. 3) [225, 306].



Фиг. 3. Схематично представяне на самоорганизиращата се мрежа от влакна и връзката с индивидуални фибрили и първичната структура на пептида. **А.** Фибрилна мрежа от организирани пептиди. **Б.** Всяка фибрилна структура се състои от четири влакна. Тънките линии представляват олигопептидите, всеки в β -конфигурация. **В.** Димерна антипаралелна структура на самоорганизация се пептид P₁₁₋₄, β -конфигурация.

Организираният в нишки P₁₁₋₄ е с отрицателен повърхностен заряд, определен от 4-те глутаминови остатъка. Те представляват потенциални активни центрове за залавяне на Ca²⁺ йони. При симулация на молекулярната динамика е установено, че тези залавни места са на разстояние приблизително 9,4 Å. Това съответства на позициите на Ca²⁺-йони по с-оста на хидроксилапатитния кристал [215, 369]. Провеждането на елементарен анализ доказва, че моларното Ca/P съотношение при новоформираните минерални структури, е 1.67 – подобно на хидроксилапатитния кристал [143]. Допуска се, че фибрите изградени от P₁₁₋₄, наподобяват анионните матриксни протеини, които контролират минералното зародишообразуване и растеж [67, 217].

Robinson и кол. определят 4 зони на подповърхностната кариозна лезия [317], като реминерализацията на тялото ѝ е от особен интерес за изследователите [37]. В тази зона промените започват най-рано и най-бързо се задълбочават. Авторите разглеждат тялото на лезията като уникална структура, която наподобява свободното пространство, което се създава при направляваната тъканна/костна регенерация [245]. В това изолирано поле, прилагането на биомиметична матрица от P₁₁₋₄, може да подпомогне естествената реминерализация от слюнката [15, 16]. Този процес е наречен направлявана емайлова регенерация (NER) [37].

Самоорганизиращият се пептид показва положителни резултати в реминерализацията на некавитиранни подповърхностни емайлови лезии *in vitro* [192, 332, 357].

P₁₁₋₄ пептидът е изпитан и в клинични проучвания. Той демонстрира реминерализиращ потенциал при начален оклузален и апроксимален кариес [36, 67, 330]. Когато изотропният пептид с нисък вискозитет се приложи върху лезията, той бързо дифундира в тялото ѝ, където се превръща в еластомерен, нематичен гел. При нематичните гелове дългите оси на молекулите са ориентирани в една посока, а самите молекули имат само

близко подреждане. Това е последвано от образуването на триизмерна мрежа, която подпомага реконструирането на лезията [67]. *Alkilzu* и кол. установяват, че комбинирането на P₁₁₋₄ с натриев флуорид води до подобри клинични резултати спрямо самостоятелното третиране на кариозните лезии с флуорен лак [37].

Въпреки регистрираните положителни резултати от използването на P₁₁₋₄, в проучване на *Yang* и кол. не се установява значимо подобрене в степента на реминерализация на лезиите, третирани с пептида [399].

Действието на самоорганизиращия се P₁₁₋₄ зависи изцяло от реминерализиращия потенциал на слюнката – количество, минерално съдържание, рН. Това ограничава приложението на този метод при пациенти с ксеростомия [330]. Несъмнено, P₁₁₋₄ е стъпка напред в идеологията за направлявана регенерация на емайла, но са необходими още изследвания, които да потвърдят получените до момента резултати, а също така да се открият допълнителни фактори, които потенцират реминерализиращия процес [216].

8.2. Биомиметични агенти, базирани на аминокиселини

Аминокиселините са основните структурни и функционални единици на протеините. В състава на амелогенина има 15-20% глутамат (Glu), чиято функция в биоминерализацията на емайла е добре проучена [364]. Glu има две карбоксилни групи, които могат да бъдат абсорбирани от апатита и да стимулират кристализация по с-оста на ХАП кристал. Апатитните наночастици действат като резервоар за калциеви и фосфатни йони, което спомага за свръхнасищането на емайловата повърхност с тези йони. По този начин Glu контролира образуването на подобна на емайла структура във физиологични условия [231].

8.3. Биомиметични агенти, базирани на амелогенин-съдържащи хидрогелове

Амелогенин-съдържащ хитозан хидрогел (CS-AMEL) е създаден за възстановяване на повърхностно увреден емайл. Механизмът на действието му включва стабилизирането на калциево-фосфатните струпвания и поддръждането им в линейни вериги [325, 326]. Хитозанът е биополимер, който е получен при деацетилиране на хитин. Той се използва поради изявения му бактерициден или бактериостатичен ефект, съчетан с отлична биосъвместимост [112]. В кисела среда аминокрупите на хитозана се протонизират, което води до създаването на положителен заряд, осигуряващ адхезията му към отрицателно заредени повърхности като зъбния емайл, меките тъкани и клетъчната мембрана [48]. Той се използва като носител в реминерализиращите системи, но не оказва влияние върху ориентацията на новообразуваните кристали. След третиране с амелогенин-съдържащ хитозан хидрогел се установява организиран, подобен на емайла слой, формиран върху ецвана повърхност [323]. В сравнение с другите биомиметични системи, CS-AMEL хидрогелът се синтезира по-лесно за клинична употреба [324].

8.4. Биоминерализиращи агенти, базирани на дендримерна структура

Търсенето на синтетични аналози на амелогенина доведе до създаването на полимерни системи за биомиметична реминерализация. Към тази група се отнасят поли(амидоамин) дендримерите (ПАМАМ) – катионни полимери, които са силно разклонени и притежават химически реактивни групи. Те се наричат още „артифициални протеини“, защото наподобяват функцията на органичната матрица при биоминерализацията на емайла. Карбоксилираните дендримери показват функции, подобни на

амелогенина, в контролирането на растежа на хидроксилапатитните кристали [81]. Конюгираният с алендронат ПАМAM-СООН дендример индуцира *in situ* реминерализация на киселинно обработен емайл [78]. Тези дендримери формират наносфери и дават възможност за контрол на кристалния растеж. Напоследък бяха синтезирани и фосфатни дендримери (ПАМAM-PO₃H₂). Третираните с тях изкуствени емайлови образци придобиват нов хидроксилапатитен слой с дебелина от 11.23 μm [82]. Проучване, проведено от *Zhu* и кол. установява, че природният флавоноид апигенин, проявяващ антибактериална активност срещу *Streptococcus mutans*, може да бъде внедрен и след това освобождаван от фосфорилираните ПАМAM дендримери. Този подход е силно обещаващ в развитието на материали, които имат изявена антикариесна активност [414]. Няколко *in vitro* проучвания от последните години също доказват тенденцията на ПАМAM-дендримерите да образуват йерархически подредени кристални структури в емайла [121, 392, 397]. Новите кристали имат същата структура, ориентация и минерална фаза като тези в интактния емайл. Следователно дендримерите могат да бъдат определени като синтетични аналози на амелогенина, чрез които се преодоляват трудностите, свързани с извличането, химическото пречистване и съхраняването на естествения протеин. Напоследък се правят опити с помощта на лазер да се ускори биоминерализацията и да се улесни включването на това средство в клиничната практика [355].

На последната международна конференция за нови антикариесни и реминерализиращи средства (ICNARA 3, 2017 г.) в Калифорния, САЩ, задълбочено се засяга проблема с продуктите, които имат способността да модулират оралния микробиом. Направена е препоръка да се развият материали, които могат да разрушават екстрацелуларния полизахариден матрикс на оралния биофилм, да осъществяват действието си в среда с ниско рН, да са с минимална токсичност и продължителен терапевтичен

ефект [133]. Такива качества проявяват поли-2-диметиламиноетил диметакрилат (ПДМАЕМА) и полисулфобетан (ПСБ).

ПДМАЕМА е полимер, който се състои от ковалентно свързани 2–(диметиламино)етил метакрилатни мономерни. ПДМАЕМА притежава третични аминогрупи в мономерната си молекула. Като мукоадхезивен полимер, ПДМАЕМА е катионен в подкиселена среда или когато е кватернизиран с алкилиращ агент. Този полимер притежава модулиращ ефект върху биофилма, включително и антибактериален ефект срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми, включително *S. mutans* [247]. Използва се в лекарство-доставящи системи, антибактериални покрития, матрица за костна регенерация и др. [380].

ПСБ принадлежи към групата на полицивтерийонните полимери. Молекулата му е електрически неутрална [249]. В изследване на *Liu* и кол. е установено, че ПСБ стимулира триизмерно нарастване на новообразувани ХАП кристали върху синтетични хидрогелни матрици [237].

8.5. Биомиметични агенти, базирани на калциево-фосфатни наночастици

По време на биоминерализацията на емайла се установява наличието на транзиторни калциевофосфатни нанопрекурсори [58]. Тяхното формиране и стабилизиране е важен етап при биомиметичната реминерализация. *Weir* и кол. проучват ефективността на нанокомпозит, съдържащ наночастици от аморфен калциев фосфат (nACP), върху реминерализацията на емайла. Посредством количествена микрорадиография е установена много по-висока степен на емайлова реминерализация в сравнение с тази на контролната група, в която е използван флуор-освобождаващ композит [388]. Поради метастабилната природа на аморфния калциев фосфат, употребата му в клинични условия е значително затруднена. АСР е много по-разтворим от кристалните

полиморфи на калциевия фосфат и във воден разтвор той бързо се трансформира в хидроксилапатит. Това е причината да се създават биомиметични системи, които го стабилизират. Въз основа на проучванията, проведени с казеин-фосфопептидите, се синтезират нано-комплекси от фосфорилиран хитозан (*Pchi*) и аморфен калциев фосфат. *Pchi* подпомага свързването на калциевы йони с цел формиране на центрове на нуклеация, адсорбира се върху повърхността на хидроксилапатитните кристали и инхибира спонтанната преципитация на калциевия фосфат. *Zhang* и кол. установяват, че степента на реминерализация при използването на *Pchi*-ACP е значително по-висока в сравнение с реминерализацията с флуор [409]. Резултатите показват, че добавянето на аналози на естествените протеини може да се окаже ефективна стратегия при стабилизирането на аморфните нанопрекурсори. Нанофибриите в хидрогелната матрица от поли(винилпиролidon) (ACP/PVP) също могат да стимулират реминерализация на зъбния емайл [144].

Тези *in vitro* проучвания показват потенциалната способност на материалите, базирани на nACP, да подпомогнат лечението и профилактиката на ранните емайлони лезии. До този момент това не е потвърдено в клинично проучване.

8.6. Нанохидроксилапатит

Синтетичният нанохидроксилапатит (nXA) е материал с добре изразена биологична съвместимост и биоактивност. Неговите морфология, структура и кристалинност наподобяват тези на апатитния кристал в емайла [164]. Наночастиците могат здраво да се свържат с емайлоната повърхност, а също така и с частици от плаковия биофилм и микроорганизмите. Малкият им размер значително увеличава контактната повърхност за свързване с емайла, но прави възможно и запълването на неравности върху повърхността му [284]. Съществуват *in vitro* проучвания, които доказват, че

реминерализацията ефект на тази система е съизмерим, а понякога дори и превъзхождащ този на флуора [271, 371]. Биомиметичният механизъм на действие на nXA не е напълно изяснен. Според едни автори той създава изцяло нов синтетичен слой върху емайла или отлага апатитни наночастици върху емайловите дефекти [284]. Други автори предполагат, че nXA действа като резервоар на калциеви и фосфатни йони и по този начин се потиска деминерализацията и подобрява реминерализацията. *Huang* и кол. установяват, че nXA преимуществено стимулира реминерализация на повърхностния емайлов слой, докато повлияване на тялото на лезията не се наблюдава [181].

Въпреки че продукти, съдържащи nXA се предлагат на пазара от 1980 година, все още няма категорични доказателства за клиничната им ефективност. Необходими са допълнителни проучвания, които да потвърдят действието им и да ги превърнат в първо средство на избор за клиницистите по отношение на нефлуоридната кариесна профилактика.

8.7. Други биомиметични агенти

В тази група се отнасят полизахариди като агарозния хидрогел [117] и желатина. Установено е, че хидроксилапатитен слой може да бъде формиран при модел на изкуствен кариес като е използван агарозен хидрогел, в който има калциеви йони и висока концентрация на флуорид [72].

9. АНАЛИЗ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

Напредъкът в съвременната превантивна и минимално-инвазивна дентална медицина определя необходимостта от развитието на алтернативен подход в емайловата реминерализация. Въпреки че биомиметичните реминерализиращи системи отбелязаха развитие през

последните години, разработването на материали със сходни на емайла качества, продължава да бъде предизвикателство за изследователите [324].

Проучването на ефективността на новосинтезираните системи за реминерализация на емайла, изисква надежден модел на изкуствен кариес. В литературата не съществува универсален метод за създаването му. Химичните модели се различават по използваните деминерализиращи вещества, киселинността им и времето, за което се прилагат. Физичните и механичните характеристики на изкуствените лезии не са еднакви и това затруднява сравняването на резултатите между проучванията [269]. Поради тази причина е важно образуваните моделни емайлови лезии да бъдат детайлно изследвани и описвани за всеки експеримент [403]. Химичните модели не пресъздават комплексния метаболизъм в плаковия биофилм, но правят експеримента стандартизиран и възпроизводим.

Използването на аналози на протеините, свързани с биоминерализацията, подпомага направляването и регулирането на нуклеацията, ориентацията и растежа на хидроксилапатитните кристали.

Полимер-контролираната биомиметична реминерализация на калциевите фосфати е добре изучена [61, 111], но много малка част от проучванията са фокусирани върху зъбния емайл. Те показват обещаващи резултати, но към настоящия момент, нито една от полимерните системи не се прилага клинично, поради установените недостатъци. Това дава основание да се изследва влиянието на други полимери, които да ги превъзможнат.

Поликатионните полимери (ПДМАЕМА и ПСБ) могат да взаимодействат с отрицателно заредената емайлова повърхност [249]. Необходимо е проучване дали това променя физикохимичните ѝ качества, стимулирайки реминерализацията и инхибирането на образуване на плаков биофилм.

При прегледа на литературата не открихме проучване, в което да са използвани ПДМАЕМА и ПСБ в комбинация с калциеви фосфати.

Един от най-добре изучените биомиметични агенти за емайлова реминерализация е самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄. Подобно на амелогенина, той претърпява едномерна организация в тялото на подповърхностната емайлова лезия. Там пептидът се трансформира в триизмерна мрежа, чиито характеристики наподобяват емайловия матрикс. Поради тази причина, някои автори определят терапията с P₁₁₋₄ като направлявана емайлова регенерация. Необходимо е микроструктурната цялост и фазово-граничната интеграция между новосинтезирания емайлов слой и подлежащата зъбна структура да бъдат изследвани допълнително. Това ще даде информация дали е налична ориентирана кристализация и подреждане на новообразуваните кристали в емайлови призми. Проследяването на динамиката в протичащите кинетични процеси през определени времеви интервали би подпомогнало изучаването на механизмите на действие на тази система.

Клиничното приложение на биомиметичните реминерализиращи системи е все още в начален етап на развитие. P₁₁₋₄ е единствената пептидна система, използвана за реминерализация на емайла *in vivo* [288]. Броят на клиничните проучвания на пептида е оскъден и към момента P₁₁₋₄ не е изследван у нас. Необходими са контролирани клинични проучвания, които да установят продължителния ефект от приложението му. Анализът на резултатите изисква прецизна диагностична техника, тъй като промените в минералното съдържимо при начални кариозни лезии са трудно уловими с конвенционалните диагностични методи [192].

Количествената светлинна флуоресценция се определя като един от най-точните методи за проследяване на динамиката в минералната структура на емайла [299]. Методът се прилага както в лабораторни, така и в клинични проучвания, което дава възможност за по-задълбочен

сравнителен анализ на резултатите. Не открихме литературни данни за клинично изследване, в което се използва КСФ за оценка на реминерализацията с P₁₁-4.

Постиженията на молекулярната биология и биотехнологиите разкриват възможност за трансформирането на традиционния подход при лечението на емайловия кариес в регенеративен. Прегледът на достъпната ни литература, свързана с тази актуална тема, показва, че тя е в начален, но много активен етап на развитие. Необходими са допълнителни проучвания, които да изяснят механизма на действие на биомиметичните системи в реминерализацията на емайла.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат възможностите на биомиметични реминерализиращи системи в неоперативното лечение на начални емайлови кариозни лезии по гладки зъбни повърхности.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.
2. Изследване на реминерализиращия потенциал на две полимер-контролирани биомиметични системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.

2.1. Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализираща система (ПДМАЕМА/Карбомер/CaP).

3. *In vitro* изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.
4. Клинично проучване за оценка на реминерализиращия ефект на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄ върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

IV. МАТЕРИАЛ

За целта на дисертационния труд са проведени лабораторни и клинични изследвания.

Материалът, използван за осъществяване на проучванията, е следният:

- *За in vitro проучванията:*

	Брой зъби	Брой срезове
Задача 1	20	40
Задача 2	60	120
Подзадача 2.1.	30	60
Задача 3	30	120

- *За in vivo проучването:*

45 пациенти, 120 начални емайлови кариозни лезии по гладки повърхности

По задача 1.

Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.

In vitro изследването се осъществява върху 20 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтски показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 40 среза.

Материали, използвани за подготовката на образците:

- двустранен диамантен сепаратор за разрязване на образците SuperFlex (*Oekodent, Germany*).
- полиране на емайловите повърхности – полирна паста Proxyl fluoride free (*Ivoclar Vivadent, Lichtenstein*) и полирна четка с цилиндричен профил (*Edenta, Switzerland*), полирни дискове с големина на частиците 320, 600, 1200 (*Super-Snap Rainbow Technique Kit, Shofu Dental Corporation, Germany*), диамантена суспензия Buehler 1 μm (*GmbH, Germany*).
- екскаватор с овална работна част 17 W за ексхолеиране на коронковата пулпа (*Medesy, Italy*).
- киселинноустойчив лак за лакиране на образците (*Clarins varnish, France*).
- Самополимеризираща пластмаса за фиксиране на образците – (*PoliDent, Slovenia*).

Апарати:

- ултразвукова вана за промиване на образците - Digital Ultrasonic Cleaner CD-4820 (*Shenzhen Codyson Electrical Co., Ltd, China*) при честота 42,000 Hz.

За деминерализацията на образците се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина, съдържащ 2.2 mM CaCl_2 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0,1 ppm NaF , съхраняван при температура 4°C. Разтворът е приготвен в Институт по обща и неорганична химия, БАН.

По задача 2.

Изследване на реминерализационния потенциал на две полимер-контролирани биомиметични реминерализационни системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.

In vitro изследването се осъществява върху 60 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтски показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 120 среза.

Материали, използвани за подготовката на образците:

Използват се материалите, които бяха посочени в задача 1.

За деминерализацията на образците се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина, съдържащ 2.2 mM CaCl₂, 2.3 mM NaH₂PO₄, 0,1 ppm NaF.

Разтворът на изкуствена слюнка е със следния състав: **KH₂PO₄** - 0.33g, **Na₂HPO₄** - 0.34 g, KCl – 1.27 g, **NaSCN** – 0.16 g, **NaCl**- 0.58 g, **CaCl₂** – 0.17 g, **NH₄Cl** – 0.16 g, **урей** – 0,2 g, **глюкоза** – 0,03 g, **аскорбинова киселина** – 0,002 g, **муцин** – 1 g (**MUCIN TYPE I-S 1, SAFSM3895, Sigma Aldrich, USA**) в 1000 ml дестилирана вода [387]. Разтворите на млечна киселина и изкуствена слюнка са приготвени в Институт по обща и неорганична химия, БАН.

Материали за реминерализация

За реминерализацията с флуорен гел - **GEL 7**, (30ml x 36, *Germiphene, Canada*) – 1.1% неутрален NaF топикален гел, препоръчван за употреба при лица над 18 години.

За синтезирането на **поли-2–(диметиламино)етил метакрилат (ПДМАЕМА)/Карбомер/СаР** - 2–(диметиламино) етилметакрилат, CaCl₂, K₂S₂O₈, тетраметилетилендиамин, Carbomer 940 (*Sigma-Aldrich, USA*).

За синтезирането на **Полисуфлоробетин (ПСБ)/СаР** – Сулфобетин мономер, метилен-бис-акриламид, CaCl₂ сорбитан моностеарат (Span 60) – *Sigma-Aldrich, USA*. Циклохексан и K₂HPO₄ (*Merck, Germany*).

Апарати:

- DiagnoDent Pen (*LF2190, DIAGNOdent, KaVo, Biberach, Germany*) – използва червена светлина с дължина на вълната 655 nm.

По подзадача 2.1.

Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализационна система (ПДМАЕМА/Карбомер/СаР).

In vitro изследването се осъществява върху 30 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтски показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 60 среза.

Използваните материали са същите като в задача 2.

По задача 3.

***In vitro* изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.**

In vitro изследването се осъществява върху 30 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтски показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 120 среза.

Материалите, използвани за подготовката на образците и деминерализация са същите, които бяха посочени в задача 1.

Материали за реминерализация:

За третиране на изкуствените лезии се използват 10 броя лиофилизирани монодозни самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄ – Curodont (*Credentis, Switzerland*) и флуорен лак FluorProtector S (*Ivoclar Vivadent, Lichtenstein*) – 7700 ppm аминофлуорид.

По задача 4.

Клинично проучване за оценка реминерализиращия ефект на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄ върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

В изследването се включват 45 пациенти на възраст между 25 и 30 години, живеещи в гр. София. Пациентите са запознати с естеството на проучването и са подписали информирано съгласие (Приложение № 3). Подбрани са начални букални кариозни лезии, чийто брой е 120.

Материали, използвани при реминерализацията на кариозните лезии:

- Curodont Repair (*Credentis, Switzerland*) – самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.
- FluorProtector S, (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – флуорен лак със съдържание на аминофлуорид, 7000 ppm F.
- CHLORAXID 2,0% (*Cerkamed, Poland*) – за премахване на придобитата пеликула преди апликацията на пептида.
- Blue Etch, 36 % ортофосфорна киселина (*Cerkamed, Poland*) – за ецване на емайловата повърхност преди апликацията на пептида.
- Proxyl paste (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – паста за полиране без съдържание на флуор.

- OptraGate (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – за изолация на оперативното поле.

Продукти за извършване на орално-хигиенни процедури по време на проучването:

- Elmex (*GP GABA GmbH, Hamburg, Germany, 1400 ppm F*) – паста за зъби.

- Elmex Caries Protection 39, medium (*GP GABA GmbH, Hamburg, Germany, 1400 ppm F*) – четка за зъби.

Парафинови пелети за оценка на стимулирания слюнчен ток - CRT Paraffin Pellets (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*).

V. МЕТОДИ

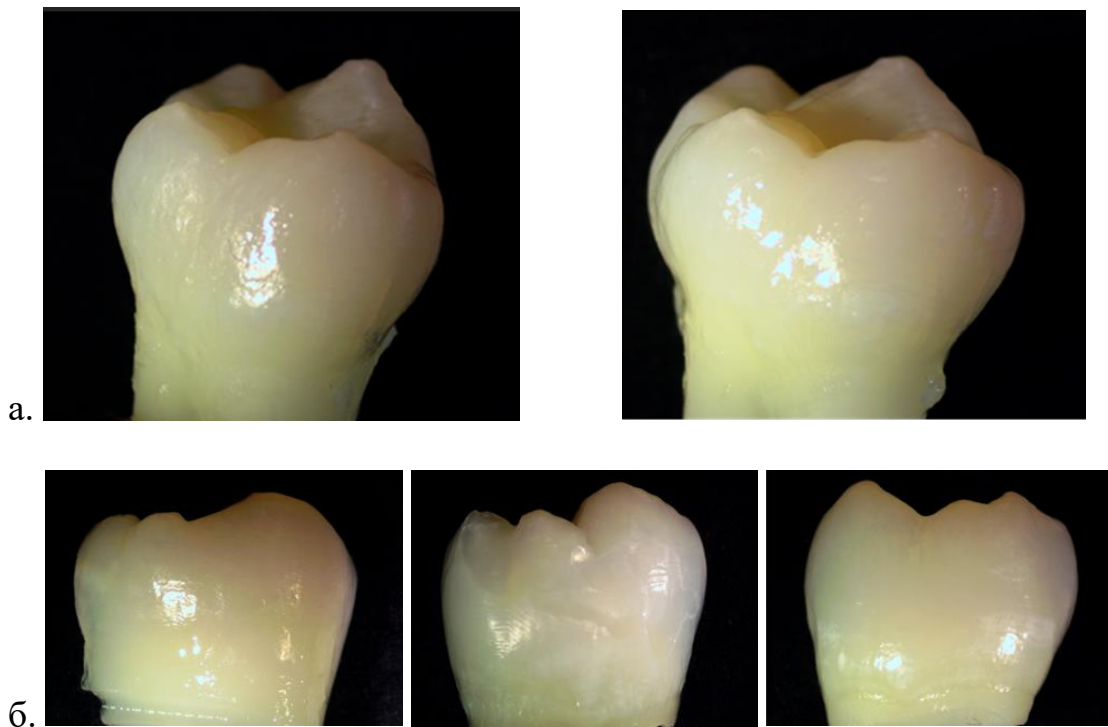
По задача 1.

Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.

Подготовка на образците

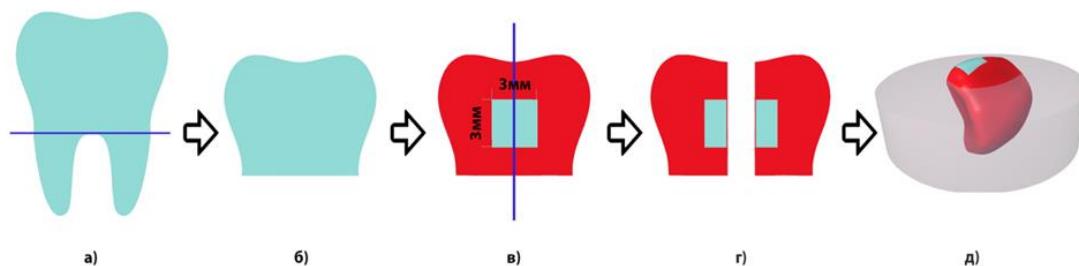
Непосредствено след екстракцията, зъбите са почистени от органични материи с помощта на пародонтална кюрета и полирани с полирна паста и четка. До началото на експеримента образците се съхраняват в 0.1% воден разтвор на тимол при 4°C. Преди началото на изследването зъбите се наблюдават под стереомикроскоп (увеличение x40) (*Leica S6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) за наличие на емайлови дефекти като пукнатини, кариес, оцветявания и неподходящите се отстраняват и заменят с нови (фиг. 4). Радикуларната част на всички зъби се срязва на нивото на емайло-циментовата граница с двустранен диамантен сепаратор при добро водно охлаждане, а коронковата пулпна тъкан се ексскохлеира чрез екскаватор.

Коронарната част на зъбите се разполовява сагитално с помощта на двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане като се получават вестибуларна и лингвална половина. Емайловата повърхност на вестибуларната половина се обработва чрез нарастващи по финост дискове от силиконов карбид и финално полиране с 1 µm диамантена суспензия. След това образецът се лакира с два слоя киселинноустойчив лак с изключение на квадратно поле в екваторната област с размери 3x3 mm² (фиг. 5в) и се оставя да изсъхне при стайна температура.



Фиг. 4. Наблюдение на **а.** цели зъбни коронки и **б.** надлъжни срезове под стереомикроскоп (x40) за наличието на дефекти.

Така подготвената вестибуларната емайлова половина се разделя надлъжно чрез двустранен диамантен сепаратор и добро водно охлаждане на две симетрични части (фиг. 5г). Разрезните повърхности също са лакирани с два слоя киселиннорезистентен лак и се оставят да изсъхнат на стайна температура. Непосредствено преди изследването зъбите са обработени за 10 min в ултразвукова вана с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат върху абсорбционна хартия. След това образците се фиксират в блокче от самополимеризираща пластмаса, за да се осигури стабилна и равна повърхност за извършване на експеримента (фиг. 5д).



Фиг. 5. Схематично представяне на препарационната техника на образците:

- а) Радикулярната част на зъба се отстранява, а коронката се разполовява на две като се съхранява вестибуларната половина;
- б) Вестибуларната половина на коронката се полира;
- в) Нанесят се два слоя киселиннорезистентен лак с изключение на квадратно прозорче с размери 3mm/3mm;
- г) Вестибуларната половина се разделя на две и разрязаните повърхности се лакират;
- д) Образецът се поставя в блокче от самополимеризираща пластмаса като nelaкираната повърхност е свободна за изследване.

Деминерализация на образците:

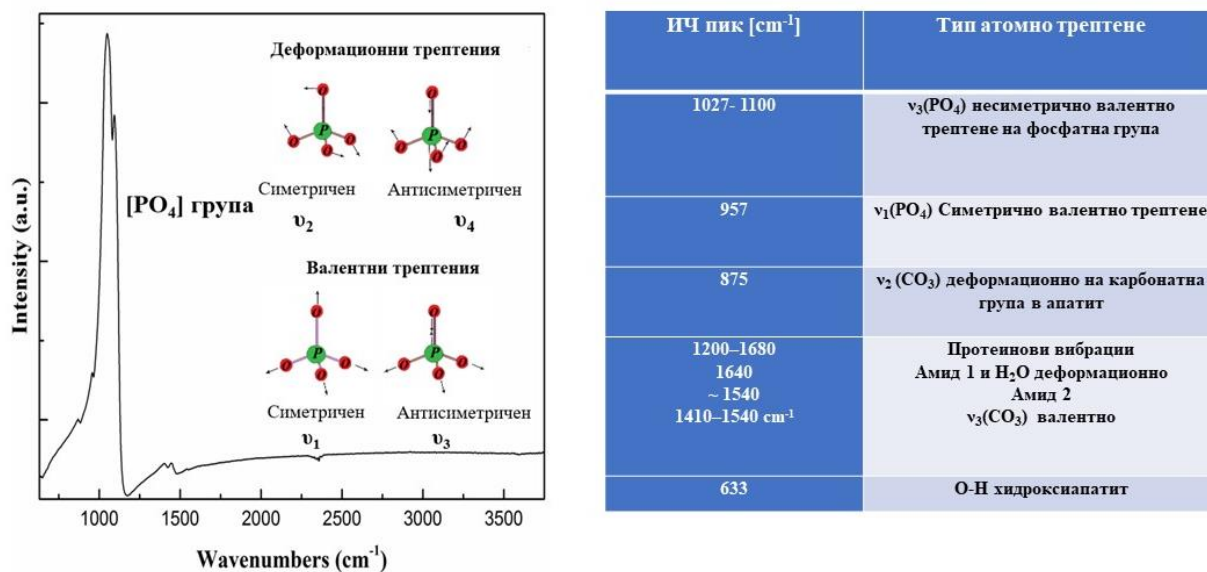
За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина. Киселинността на разтвора е коригирана с 50% NaOH, като се получава $pH=4.5$. На деминерализация в 100 ml разтвор се подлага едната половина от вестибуларната зъбна пластина, а другата служи за нейна отрицателна контрола. Деминерализиращият разтвор се подменя ежедневно в рамките на 6 дни. След деминерализацията образците отново се промиват в ултразвукова ваничка с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура.

Инфрочервена спектроскопия (ИЧ спектроскопия)

Измерванията са проведени с ИЧ микроскоп Hyperion 2000 (*Bruker, United Kingdom*), снабден с MCT детектор с азотно охлаждане, в режим на

отражение с 15X Cassegrain обектив. Спектрите се измерват със спектрална разделителна способност 4 cm^{-1} от област с размер $100\times 100\text{ }\mu\text{m}$ с осредняване на 128 сканирания. Използва се OPUS 6.5 софтуер (*Bruker, United Kingdom*). За всеки от образците са измервани от 3 до 7 спектри от различни области с максимално отражение. Спектрите са обработени и начертани със софтуерен пакет Origin 9. Изследването е извършено в Лаборатория по инфрачервена спектроскопия към Институт по минералогия и кристалография „Акад. Иван Коств“, БАН.

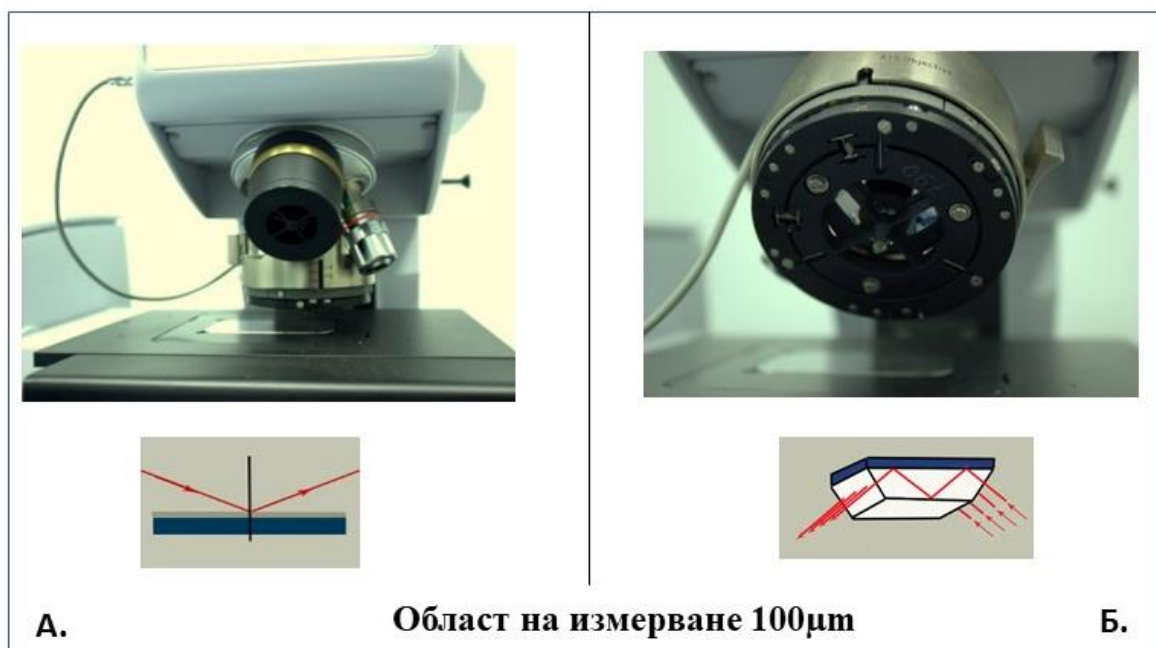
По инфрачервените спектри на поглъщане може да се определи строежа на молекулата на различни органични и неорганични вещества. На фиг. 6 са показани основните форми на регистрираните трептения и съответните пикове, при които се констатира дадена група от емайловия апатит.



Фиг. 6. Видове трептения и установените ИЧ пикове.

По-голямата част от образците бяха измерени в режим на отражение (фиг. 7А). Измерванията на някои образци са тествани в режим на нарушено пълно вътрешно отражение (ATR) с използване на Ge-ATR обектив. Този метод е препоръчителен за измервания на образци с по-ниска степен на

кристалинност, които не могат да бъдат измерени в режим на отражение (фиг. 7Б).



Фиг. 7. ИЧ микроскоп Nuregion 2000. **А.** Обектив, предназначен за режим на директно отражение; **Б.** Обектив, използван за режим на нарушено пълно вътрешно отражение.

Рентгено-структурен анализ

Използва се апарат за рентгено-структурен анализ D500 (*Siemens, Germany*) (фиг. 8). Методът се прилага за охарактеризиране на фазовия състав на получените калциеви фосфати по емайловите повърхности и изчисляване размера на кристалитите. Пробите са изследвани в режим на отражение при следните параметри:

- стъпка на брояча – $2\theta=0.05^\circ$;
- време на броене на стъпка – по 20 секунди (за някои проби с по-неравна повърхност 40 секунди), в ъгловия интервал от 30 до $80^\circ 2\theta$.

Размерът на кристалитите е числено определен по формулата на Шерер за добре изразения рефлекс на $64.40 \text{ deg } 2\theta$:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

където:

- τ - размер на кристалита;
- K – фактор на формата, който обикновено е константна величина, близка до 0.9;
- λ – дължина на рентгеновия лъч;
- β – линейна величина, изчисляваща половината от максималния интензитет на лъчението; обикновено се обозначава като 2θ ;
- θ – ъгъл на Браг, в случая 64.40.



Фиг. 8. Рентгено-структурен дифрактометър D500 (*Siemens, Germany*).

Изследването е извършено в Лаборатория по рентгено-структурен анализ към Лабораторията по структура и свойства на полимерите, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“.

Микротвърдост по Vickers

Използва се апарат *Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria)* (фиг. 9) и избрана големина на товара 300 g при време от 15 секунди. На всеки образец са направени 5 измервания в различни точки като минималното разстояние между отделните точки е 120 μm [208]. Извършва се като разположения перпендикулярно на изследвания обект индентор, прави отпечатък по повърхността на образца при предварително зададените параметри. Диагоналите на получения отпечатък се измерват чрез оптичен микроскоп и се използват за изчисляване на микротвърдостта като се прилага следната формула:

$$HV = 1854 (F/d^2)$$

Константната в уравнението е изчислена от специфичната геометрия на индентора, F е товарът, измерен в грамове (g), а d е дължината на диагонала на отпечатъка (μm).

На базата на получените резултати е изчислена средната стойност на VHN (Vickers Hardness Number) и съответните стандартни отклонения за всеки образец.



Фиг. 9. *Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria).*

Изследването е извършено в Лаборатория по структура и свойства на полимерите, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“.

Сканираща електронна микроскопия (SEM)

Използва се сканиращ електронен микроскоп JOEL 5510, работещ при електрическо напрежение 10 kV в лаборатория „Електронна микроскопия“, ФХФ, СУ „Св. Климент Охридски“. Предварително образците се дехидратират и покриват със златен слой в устройство за покриване с тънки филми JOEL, с време на покриване 100 секунди. Изследването дава информация за повърхностната морфология на нетретираната с киселина и деминерализираната емайлова повърхност.

По задача 2.

Изследване на реминерализационния потенциал на две полимер-контролирани биомиметични реминерализационни системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.

- **Подготовка на образците**

Подготовката на образците е като описаната в задача 1.

- **Деминерализация на образците:**

За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина (pH=4.5). Всички емайлови образци се подлагат на деминерализация в 100 ml разтвор на киселината за 6 дни.

Методиката е подробно описана в задача 1.

- **Реминерализация на образците**

Образците се разпределят по равно ($n=20$), на случаен принцип, в три експериментални групи:

Група 1 (n=20): Изкуствена слюнка

Всеки образец от тази група е потопен в 20 ml от разтвора на изкуствената слюнка. Изкуствената слюнка се подменя ежедневно в период от 7 дни.

Група 2 (n=20): Флуорен препарат

Използва се GEL 7, (*Germiphene, Canada*) – 1.1% неутрален NaF топикален гел, препоръчван за употреба при лица над 18 години. Гелът се нанася с апликатор за 5 min, съгласно инструкциите на производителя и се оставя да престои за 30 min. След това излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Група 3 (n=20): Полимер-съдържащи системи:

Група 3.1. (n=10): Система 1: ПДМАЕМА/Карбомер/СаР – подготовка на суспензията

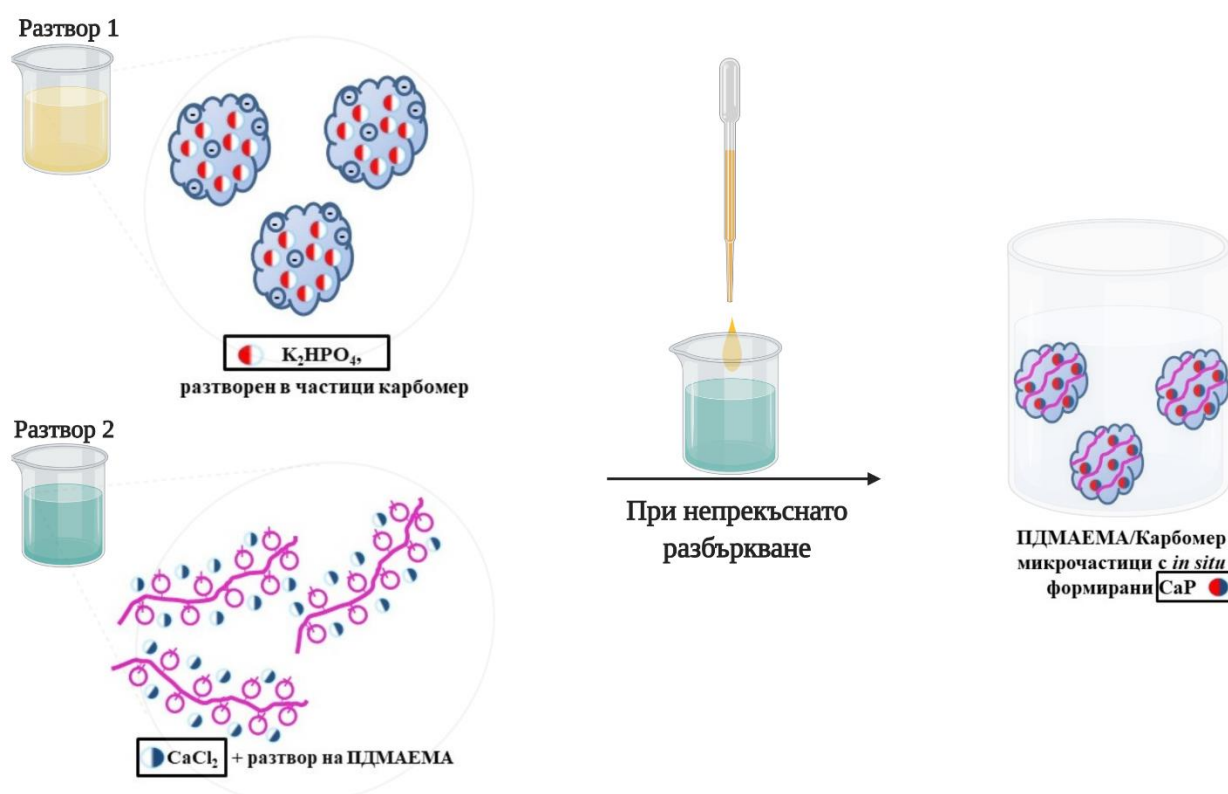
Синтезиране на поли-2-(диметиламино)етил метакрилат (ПДМАЕМА)

Линейната молекула на ПДМАЕМА се синтезира чрез процес на радикална полимеризация в 2M воден разтвор на 2-(диметиламино)етилметакрилатни мономери в присъствието на 0.1 mol% $K_2S_2O_8$ (калиев персулфат) и 0.2v/v% тетраметилетилендиамин (TEMED). Полимеризацията се извърши при стайна температура 25°C за 24 часа. След края на процеса реакционната смес се поставя в диализна тръбичка (3.5K MWCO, 16 mm, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, Thermo Scientific, Waltham, САЩ) и се пречиства до пълното отстраняване на нереагиралите радикали. Присъствието на химични вещества в промивната дестилирана вода се проследява ежедневно чрез УВ спектрофотометър (BOECO S-20, BOECO,

Germany). Пречистеният полимерен разтвор се подлага на лиофилизация и под формата на лиофилизиран прах се използва в следващите стъпки на експеримента.

Синтезиране на композиционни микрогелове от ПДМАЕМА/Карбомер/СаР

Суспензия на Carboxomer (слабо омержена полиакрилова киселина) + K_2HPO_4 (рН=5.6) (**разтвор 1**) се смесва с разтвор на ПДМАЕМА в 1% оцетна киселина (рН=3.2) + $CaCl_2$ (**разтвор 2**). Към разтвор 2 (3 ml) се прикапва от разтвор 1 (3 ml) при постоянно разбъркване до получаване на колоиден, опалесциращ разтвор, непосредствено преди апликацията (фиг. 10).



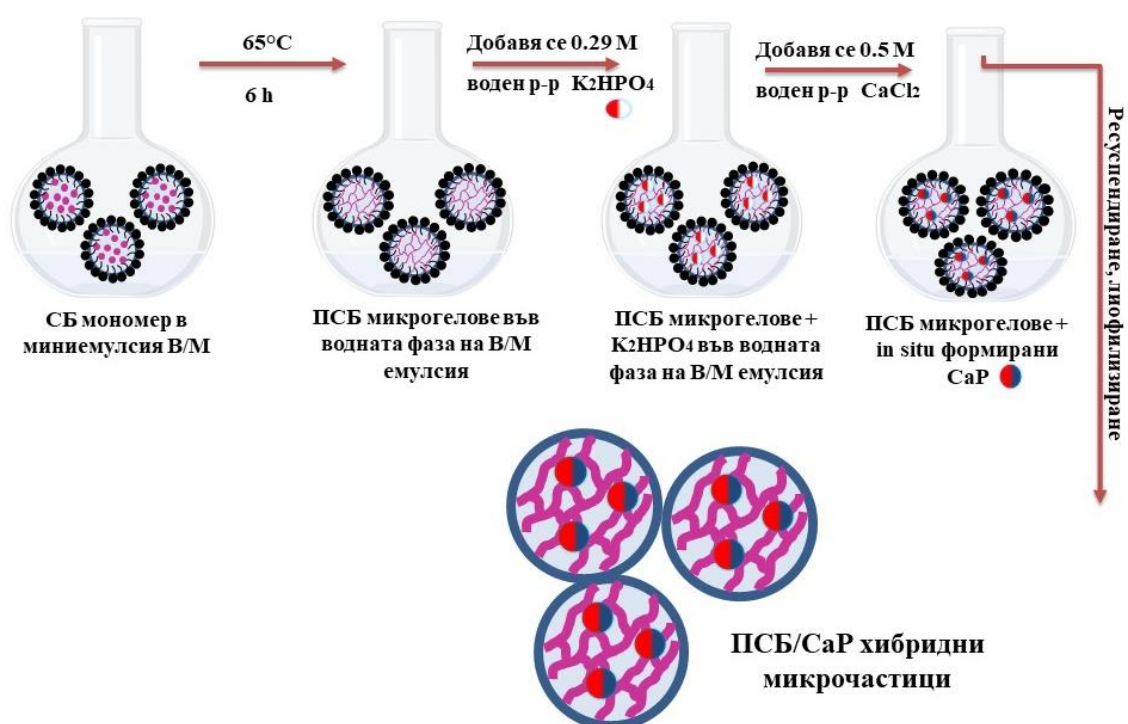
Фиг. 10. Схематично представяне на опитната постановка, при която *ex tempore* се получава системата ПДМАЕМА/Карбомер/СаР.

Концентрацията на четирите изходни вещества е подбрана, така че крайното тегловно съотношение между полимерите и формираните калциеви фосфати, да е 1:1.

Група 3.2. (n=10) Система 2 ПСБ/СаР - подготовка на суспензията

Системата ПСБ/Калциеви фосфати е създадена в обратна миниемулсия - вода-в-масло (В/М). Емулсионните капки (дисперсна фаза) се състоят от воден разтвор на мономера (ПС) с добавени инициатор – калиев персулфат (0.1 mol% спрямо мономера) и омрежващ агент – метилен-бис-акриламид (4 mol% спрямо мономера). Получените микрогелове ПСБ/калциеви фосфати се ресуспендират във вода и се лиофилизират (фиг. 11).

Непосредствено преди апликацията, 100 mg от лиофилизирания прах се разтвярят с 3 ml дейонизирана вода.



Фиг. 11. Схематично представяне на получаването на ПСБ/СаР хибридни микрочастици.

Суспензиите се нанасят с апликатор за 5 min и се оставят да престоят за 30 min. След това излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Лабораторни методи на изследване

За регистрирането на изходните параметри се прилагат недеструктивните лабораторни методи върху полирана, интактна емайлова повърхност – ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ, лазерна флуоресценция (ЛФ).

Оценката на изкуствения кариес се извършва върху едната половина на зъбния образец, а степента на реминерализация се оценява върху симетричната ѝ половина.

Методиката на ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ и СЕМ след реминерализацията е описана в задача 1.

Лазерна флуоресценция (ЛФ)

Методът е неинвазивен и използва червена светлина с дължина на вълната 655 nm. Прилага се предимно в клиничната практика като резултатите се отчитат на скала от 0 до 99. Стойностите, които са по-високи от 13, показват наличието на кариозна лезия (табл. 9) [27]. Използва се апарат DIAGNOdent Pen (*LF2190, DIAGNOdent, Kavo, Biberach, Германия*). За целите на това проучване е използван накрайник “В”, който е предназначен за изследване на оклузални и гладки повърхности и се позиционира перпендикулярно на измерваната зъбна повърхност. Апаратът се калибрира съгласно инструкциите на производителя и се рекалибрира на всеки 5 образца. Всеки образец се изследва трикратно при интактна, деминерализирана и реминерализирана повърхност като се отчита най-високата стойност от всяко измерване.

Таблица 9. Диагностична таблица на резултати от лазерна флуоресценция с DiagnoDent Pen.

Установени стойности	Диагноза – лечение
0 до 13	Интактна повърхност – професионална орална хигиена
14 до 20	Емайлов кариес – професионална орална хигиена и флуоризиране
21 до 29	Дълбок емайлов кариес – професионална орална хигиена, флуоризиране, мониториране, корекция на рисковите фактори, минимално инвазивни възстановявания
>30	Дентинов кариес – минимално инвазивни възстановявания, професионална орална хигиена

По подзадача 2.1.

Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализационна система (ПДМАЕМА /Карбомер/ СаР).

Едната част на образеца се използва за оценка на инициалните стойности и след деминерализацията, а симетричната ѝ половина за оценка на ефекта от реминерализация.

Суспензията от ПДМАЕМА/Карбомер/СаР се нанася върху съответната половина с апликатор за 5 min и се оставя да престои за 6 часа. След това излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Прилага се методът за определяне на микротвърдост по Викерс. Използва се апарат *Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria)* и избрана големина на товара 300 g при време от 15 секунди. На всеки образец са направени 5 измервания в различни точки като минималното разстояние между отделните точки е 120 μm. Микротвърдостта се изчислява във Vicker's Hardness Number (VHN). Методиката на изпълнение е аналогична с тази в задача 1.

По задача 3.

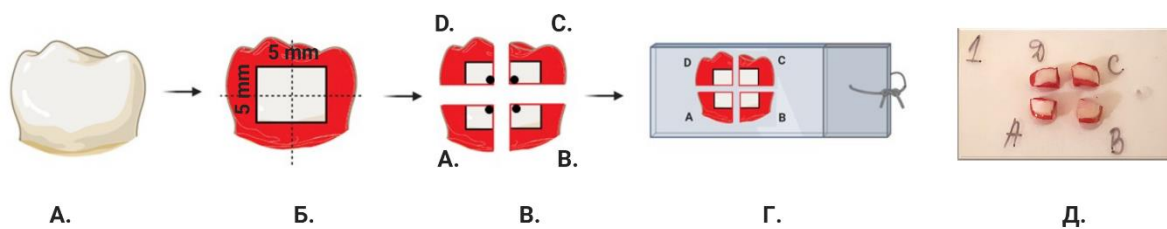
In vitro изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.

Подготовка на образците

Подборът и предварителната подготовка на зъбите са описани в задача 1.

Коронарната част на зъбите се разполовява сагитално с помощта на двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане като се получават вестибуларна и лингвална половина. Вестибуларната половина е с дебелина 3 mm. Емайловата повърхност се обработва чрез нарастващи по финост дискове от силиконов карбид и финално полиране с 1 μm диамантена суспензия. След това образецът се лакира с два слоя киселинноустойчив лак, с изключение на квадратно поле в екваторната област с размери 5x5 mm² (Фиг. 12Б).

Вече лакираната вестибуларната емайлова половина се разделя чрез двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане на четири симетрични части, условно обозначени като **A, B, C, D**. Изследванията се извършват в максимално доближаващи се точки между четирите симетрични образци от една и съща емайлова зона, като така се осигурява възпроизводимостта на експеримента (фиг. 12В). Разрязаните повърхности се лакират с два слоя киселинноустойчив лак. Непосредствено преди експеримента образците се обработват за 10 min в ултразвукова вана с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат при стайна температура върху абсорбционна хартия. Четирите части на всеки образец се фиксират чрез течен фотокомполит върху перфорирана плексигласова пластинка (6x3 cm). Извършват се изследванията чрез КСФ, микротвърдост по Викерс, Раманова спектроскопия, КМТ като се регистрират изходните стойности на параметрите, описващи интактната емайлова структура.



Фиг. 12. Препарационна техника на образците: **А.** Радикуларната част на зъба се отстранява и зъбът се разполовява медио-дистално на две части, като се съхранява букалната половина; **Б.** Букалната част се лакира с изключение на поле с размери 5x5 mm²; следва разделяне на четири симетрични части; **В.** Разрязаните повърхности също се лакират; с черни точки са означени зоните, в които ще се изследват промените в емайловата структура; **Г.** Четирите части на изследвания образец се фиксират чрез течен фотокомполит върху плексигласова пластинка; **Д.** Снимка на фиксираните части от един зъбен образец.

Методи на изследване

1. Количествената светлинна флуоресценция за оценка на минералната загуба в емайла чрез промяна в излъчената флуоресценция. Параметрите, които се изследват чрез КСФ са:

ΔF (%): Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура. Определя дълбочината на лезията. За прагова стойност на загуба на флуоресценция се избира 5%, т.е. трябва да са налични минимум 5% загуба на флуоресценция между интактен и деминерализиран емайл.

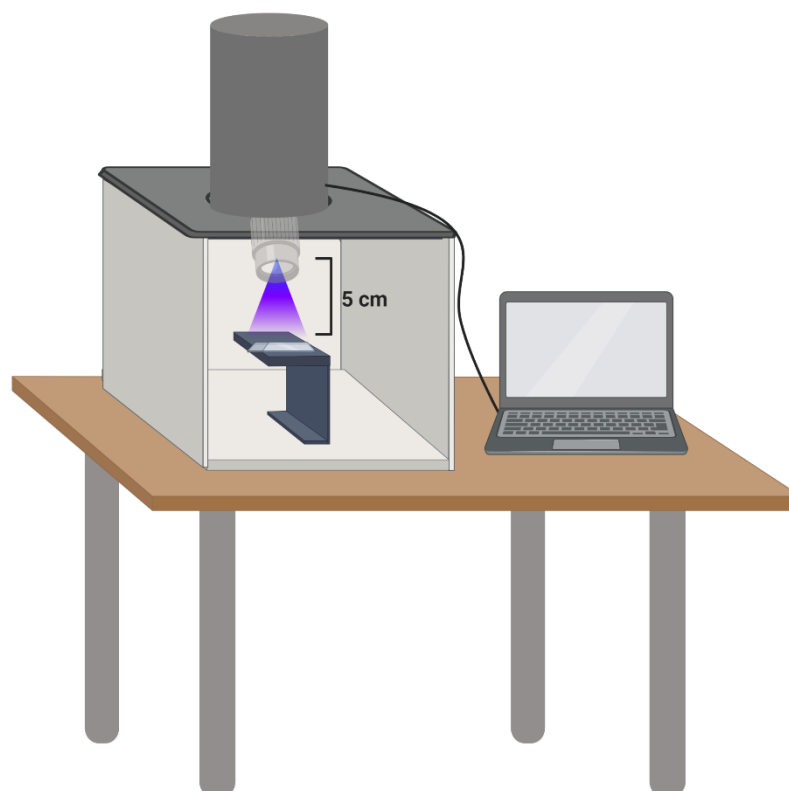
ΔQ (%px²): Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата тъкан, умножено по площта на лезията. Определя обема на лезията.

Оборудването за изследването с КСФ включва: камера и източник на синя светлина – QrayCam Pro (*Inspektor Research Systems, Amsterdam, The Netherlands* (фиг. 13), операционен софтуер, поставка за образца, лаптоп.



Фиг. 13. КСФ камера *Gray CamPro*.

Поставката осигурява стандартизирана позиция на образеца, за да се осигури възпроизводимостта на експеримента. За ограничаване влиянието на светлината се използва затворена, непрозрачна кутия, в която се поместват обективът на камерата, поставката и фиксираният образец (фиг. 14). Разстоянието между обектива и повърхността на образеца е константно – 5 cm. Първото изображение на образеца се регистрира от софтуера като базово и е отправна точка за следващите измервания. Калибрирането на апарата спрямо базовото изображение се прави преди всеки цикъл от измервания, като това се потвърждава от софтуера.



Фиг. 14. Схема на експерименталната постановка за *in vitro* изследването с GrayCam Pro.

2. Микротвърдост по Vickers – методиката на изпълнение е аналогична с тази в задача 1. Областта, в която се извършват измерванията, е отбелязана с черни точки на фигура 12В. На базата на получените резултати е изчислена средната стойност на VHN и съответните стандартни отклонения за всеки образец. Изследването дава информация за промените в механичните качества на емайла.

3. Компютърна микротомография (КМТ)

КМТ се използва за триизмерна оценка на промените в минералната плътност на емайла. Измерването се извършва чрез компютърен микротомограф Nikon XT H 225 (*Nikon Metrology, Inc., Americas*) в Лаборатория по компютърна микротомография, Институт по информационни и комуникационни технологии, БАН. Системата се състои от 225 kV микрофокусен рентгенов излъчвател, 5-осна ротационна маса и плосък детектор Varian 2520 с размер на пиксел 127 μm . Образците се

стабилизируют на държач, перпендикулярно на рентгеновия лъч. Всеки от тях се сканира индивидуално за оптимална резолюция. Образът се получава, използвайки 100 kV напрежение и 100 μ A енергия на рентгеновите лъчи. Образците се въртят непрекъснато по време на сканирането. 3000 обекта се събират от 360 градуса с 500 ms време на експозиция за обект. След приключване на изследването се използва софтуер CT Pro 3D за триизмерна реконструкция на образа. Чрез VGStudio MAX 2.2 software (*Volume Graphics, GmbH*) се визуализират данните от КМТ. След сканирането се използва софтуер СТАп (*Bruker, Kontich, Belgium*), за да се възпроизведе образ. За калибриране на измерванията се използва алуминиева пластинка с размери 6 mm в диаметър и 10 mm височина. Извършени са три сканирания - преди деминерализацията, след деминерализацията и след третирането на образците с реминерализиращите средства. Дълбочината на получените изкуствени кариозни лезии се изчислява чрез посочения софтуер. Всяка лезия се измерва в три различни зони и се регистрират средните стойности и съответните им стандартни отклонения.

Чрез софтуера се измерва т.нар. линеен коефициент на отслабване (ЛКО) за дадена област на изследване, чиито размери са предварително зададени – 10 x 10 x 10 воксела. ЛКО се определя от намаляването на енергията на рентгеновия лъч при преминаването му през определен материал. Промените в ЛКО на емайла и минералната му плътност са в правопрпорционална зависимост [333]. На базата на три последователни измервания за всяка лезия се изчислява средната стойност на минералната плътност (g/cm^3) и съответното ѝ стандартно отклонение.

4. Раманова спектроскопия (РС)

Рамановата спектроскопия изследва енергийните промени на възбуждащото лазерно лъчение, вследствие на нееластичното разсейване на светлината при взаимодействието с атомните трептения. Изследването е извършено в Лаборатория по инфрачервена спектроскопия към Институт по минералогия и кристалография „Акад. Иван Коств“, БАН.

Образците се измерват с LabRAM HR Raman system (*Horiba Jobin Yvon, France*) с вграден He-Ne лазер с дължина на вълната 633 nm и оптичен микроскоп ВН2 (*Olympus, Japan*). Спектрите се измерват с обектив с увеличение x50 в обратно отразена геометрия в област от повърхността на образеца с размер около 2 μm , в спектралния диапазон 300 – 1700 cm^{-1} . За изчертаване и обработка на спектрите се използва софтуерен пакет Origin 9.0.

5. Сканираща електронна микроскопия (СЕМ):

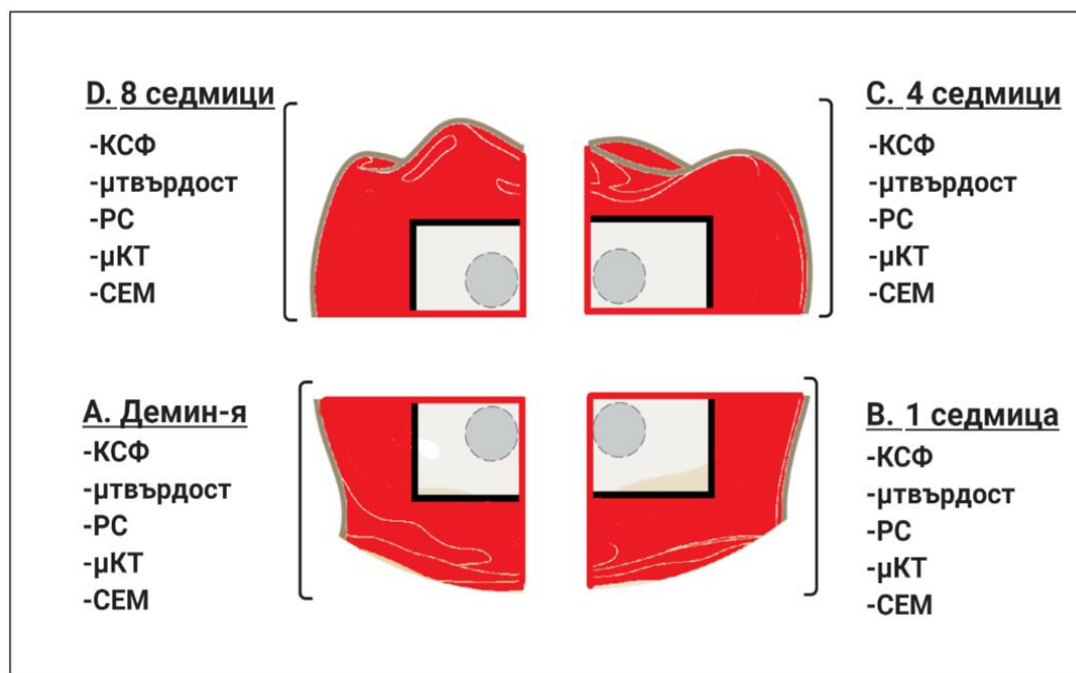
Методиката на СЕМ не се различава от описаната в задача 1.

Създаване на изкуствена кариозна лезия

За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина с рН=4.5. Деминерализиращият разтвор се подменя ежедневно в рамките на 6 дни. След завършване на деминерализационния процес на четирите части от всеки образец, те се промиват с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура. Част „А“ от всеки образец, се използва за оценка на деминерализацията като се прилагат последователно КСФ, изследване на микротвърдост по Vickers, Раманова спектроскопия, КМТ, СЕМ. Поради деструктивния характер на СЕМ, част „А“ отпада от следващите етапи на експеримента.

Реминерализация на изкуствените кариозни лезии

Оценката на реминерализацията на образците от трите групи се прави на три интервала: 1, 4 и 8 седмици, като съответно се използват части **В**, **С** и **Д** от изследвания образец и се провеждат лабораторните изследвания (фиг. 15).



Фиг. 15. Схема на последователността на включването на зъбните четвъртини в лабораторните изследвания.

Екстрахираните зъби се разделят на случаен принцип в следните експериментални групи:

Група 1 (n=10): Третиране на емайловите образци с изкуствена слюнка – отрицателна контролна група.

Използва се разтвор на изкуствена слюнка с определен състав и рН=6.5. Разтворът се подменя ежедневно за период от 8 седмици.

Група 2 (n=10): Третиране с флуорен лак и изкуствена слюнка – положителна контролна група.

Използва се флуорен лак за десенсублизация и профилактика на кариес *FluorProtector S (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein)*, който се нанася съгласно инструкциите на производителя. Върху подсушения емайл чрез апликатор се нанася една капка от флуорния лак. Изчаква се една минута, за да се изпарят разтворителите и да настъпи втвърдяването му. След апликацията образците се съхраняват в разтвор на изкуствена слюнка, който се подменя ежедневно за период от 8 седмици.

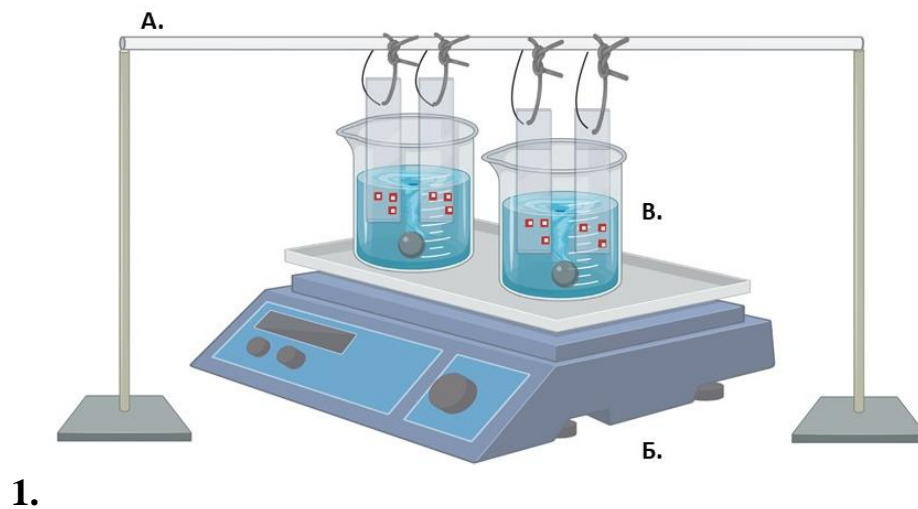
Група 3 (n=10): Третиране със самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄ и изкуствена слюнка.

Лиофилизираната форма на пептида (фиг. 16) от съответната доза се активира с 50 µl дейонизирана вода. Емайлвият образец се подсушава с разсеяна въздушна струя за 5 секунди и разтворът на P₁₁₋₄ се нанася чрез апликатор върху него. По този начин престоява за 5 min, за да се абсорбира от изкуствената кариозна лезия. След апликацията зъбите се съхраняват в разтвор на изкуствена слюнка, който се подменя ежедневно за период от 8 седмици.



Фиг. 16. Лиофилизирана монодоза на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄, предназначен за приложение *in vitro*.

След апликацията на реминерализиращите вещества, плексигласовите пластини, върху които са фиксирани зъбните образци, се подреждат върху статив и се потапят в Бехерови чаши, в които има по 100 ml разтвор на изкуствена слюнка (фиг 17).



Фиг. 17. 1. Схема на експерименталната постановка: **А.** Стъклена поставка, върху която са фиксирани образците; **Б.** Електромагнитна бъркалка, чрез която се осигурява разбъркването на разтвора на изкуствена слюнка три пъти дневно; **В.** Бехерови чаши, в които са потопени плексигласовите пластини с емайловите образци в 100 ml разтвор на изкуствена слюнка; **2.** Снимка на експерименталната постановка.

Разтворът се подменя ежедневно за периода на експеримента, съответно 1, 4 и 8 седмици. Всеки ден през интервал от 4 часа се осъществява трикратното му разбъркване посредством електромагнитна бъркалка (*IKA RCT basic, Werke GmbH & Co. KG, Germany*) и магнит, който се поставя в чашата. Всяко разбъркване е с продължителност една минута.

По задача 4.

Клинично проучване за оценка на реминерализацията на ефекта на самоорганизиращ се пептид P11-4 върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

Провежда се контролирано, рандомизирано клинично проучване с продължителност 12 месеца.

Подбор на пациенти

Критерии за включване на пациенти в изследването:

- Наличие на некавитирани лезии по гладки вестибуларни повърхности, които отговарят на критериите за инициална кариозна лезия по ICDAS II – (**код 1** – първоначални визуални изменения в емайла и **код 2** – напреднали визуални изменения), като при пациентите е проведено ортодонтско лечение с фиксирана техника.

- Не са аплицирани професионални средства за реминерализация в последните 6 месеца.

- Възраст на пациентите – между 18 и 30 години.

- Наличието на ≥ 20 постоянни зъба.

- Количеството на стимулирана слюнка ≥ 1 ml/min.

- Пациенти, които имат положително отношение към изследването и са способни да извършват редовни орално-хигиенни процедури.

- Пациентите са уведомени, че участват в клинично проучване и са подписали информирано съгласие.

- Пациентите от женски пол не са бременни и/или не кърмят по време на проучването.

- Пациентите са от един и същи демографски регион, където съдържанието на флуор в питейната вода е постоянно и не се е променяло през последните 5 години.

Критерии за недопускане на пациенти в изследването:

- Отсъствие на некавитирани лезии по гладки вестибуларни повърхности, които отговарят на критериите за инициална кариозна лезия по ICDAS II.

- Наличие на obtурации, които са в контакт с кариозните лезии.

- Апликация на реминерализиращо средство през последните 6 месеца.

- Признаци на зъбна ерозия.

- Наличие на системни заболявания като: диабет, история за онкологично заболяване в областта на главата/врата, метаболитни нарушения, засягащи калциево-фосфорната обмяна.

- Прием на медикаменти, които водят до понижаване на количеството на отделяната слюнка.

- Участие в друго клинично проучване.

- Бременни и кърмещи жени.

На фигура 18 са представени етапите на проучването:



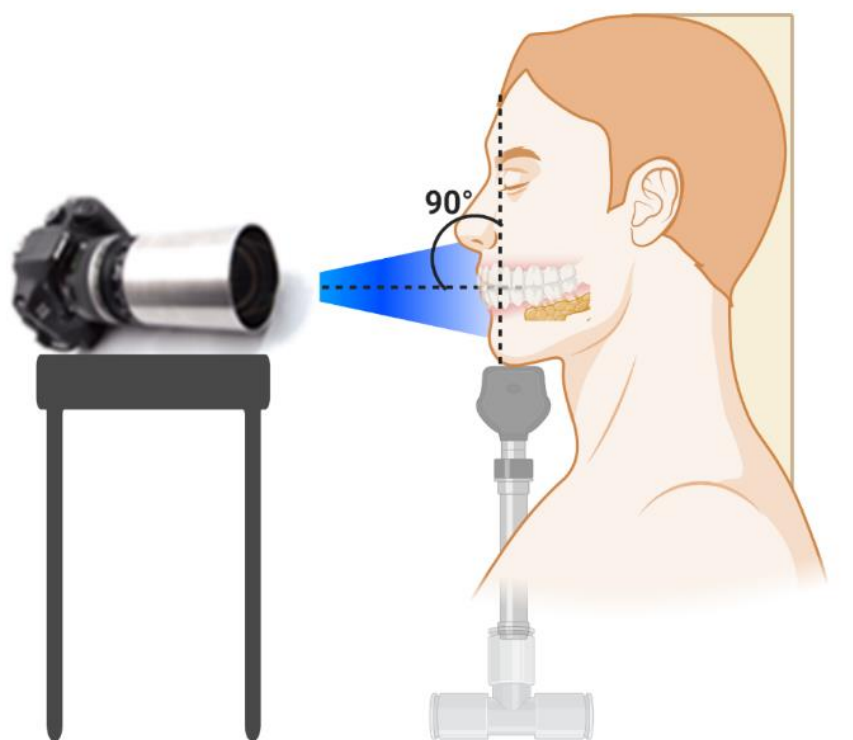
Фиг. 18. Схематично представяне на етапите от проведеното клинично проучване.

Количествена светлинна флуоресценция (КСФ)

КСФ е метод, чрез който клинично се контролира степента на реминерализация на емайла. Използва се апарат QrayCam Pro (*Inspektor Research Systems, Netherlands*). Апаратът притежава филтри, чрез които се създават две последователни изображения – с бяла светлина и с количествена светлинна флуоресценция. Деминерализираните зони се визуализират като тъмни петна, а загубата на флуоресценция е следствие от намаляването на минералното съдържимо.

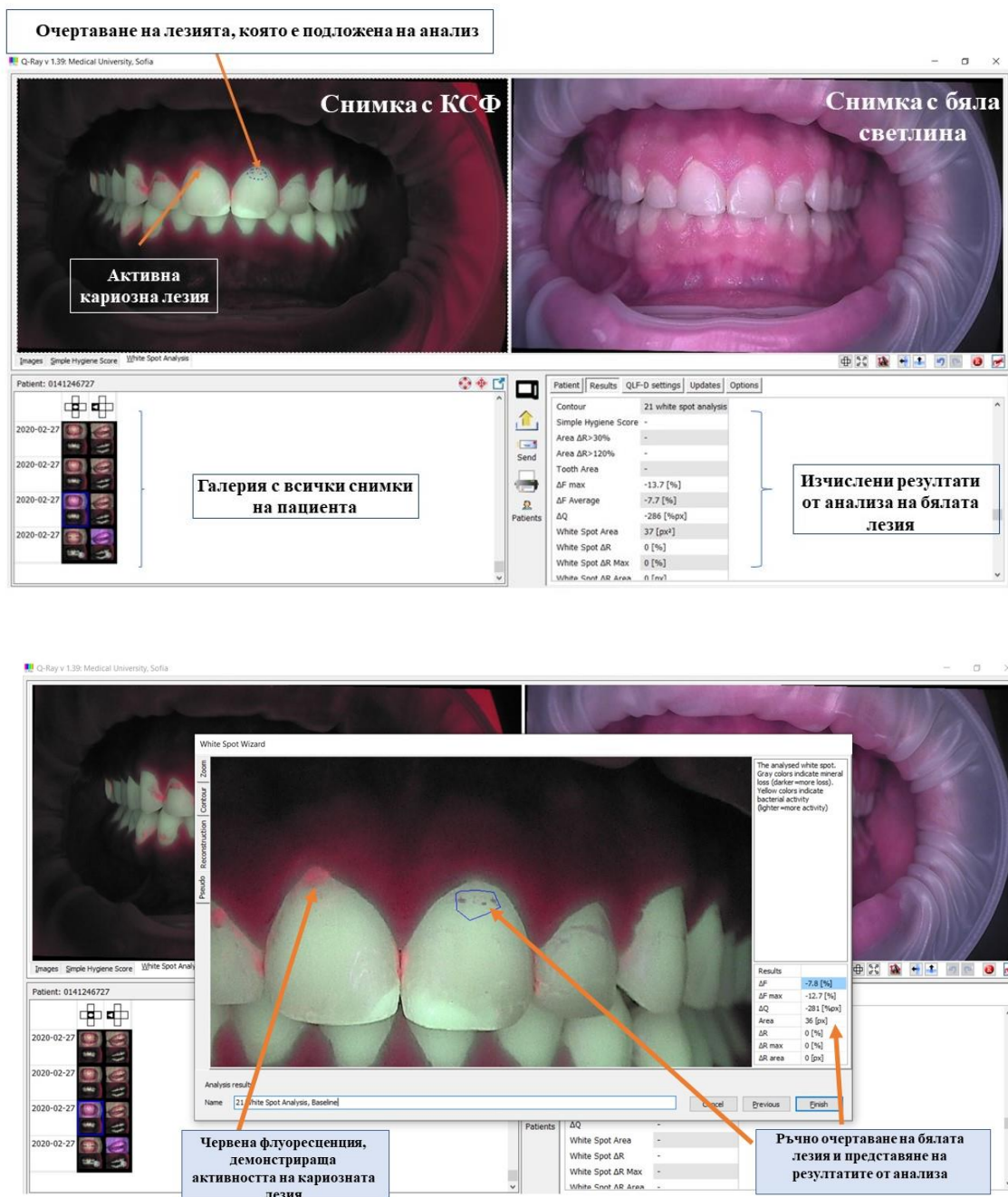
Фотодокументацията се извършва при стандартни условия, след подсушаване на зъбните повърхности с разсеяна въздушна струя за 5 секунди. Стаята е затъмнена, за да се избегне влиянието на естествената

светлина върху качеството на изображенията. Непосредствено преди да се извърши изследването се извършва професионална орална хигиена на пациентите. Камерата се поставя на статив, а обективът ѝ се позиционира под ъгъл приблизително 90° спрямо изследваната букална повърхност. Главата на пациента е изправена, като брадичката се позиционира върху поставка, която се използва при всички контролни снимки (фиг. 19).



Фиг. 19. Условия за фотодокументирането на случаите с QrayCam Pro.

Анализът на получените резултати се прави по определен протокол (Приложение № 4) чрез специално създаден за целта софтуер – *QrayCam Pro full clinical software*. Върху КСФ изображението операторът очертава всяка бяла лезия, която подлежи на анализ. Границите на очертанието се разполагат в съседната здрава структура, за да се изчисли процентното съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура (фиг. 20).



Фиг. 20. Анализ на резултатите от изображенията с КСФ чрез *QrayCam Pro full clinical software*.

В таблица 10 са посочени параметрите, които се изследват от компютърната програма:

Таблица 10. Количествени параметри, получени при КСФ изследване.

Име	Символ	Мерна единица	Описание
Делта F	ΔF	%	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура. Определя дълбочината на лезията.
Делта Q	ΔQ	% px^2	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата тъкан, умножено по площта на лезията. Определя обема на лезията.
Площ на лезията	$A_{\Delta F}$	px^2	Площ с ΔF равно или по-малко от специфичната прагова стойност на ΔF (по подразбиране – 5%).

Изчисляването на параметрите подпомага откриването и диференцирането на емайловите лезии в много ранен етап на развитие. Снимките се съхраняват и се използват за проследяването на лезиите в определените времеви интервали, а също и за обучение и мотивация на пациентите.

ICDAS

Чрез визуална оценка се определя стадият на кариозните лезии, който се отбелязва със съответните кодове (табл. 3). Началните емайлови кариозни лезии включват ICDAS кодове 1 и 2. Обратното развитие в състоянието на кариозната лезия се регистрира чрез преминаването в по-нисък ICDAS код, докато прогресията ѝ – в по-висок.

Скала на Nyvad

Чрез критериите на Nyvad се определя активността на кариозната лезия. Оценяват се кодовете за некавитирана кариозна лезия:

Код 1: Активна, некавитирана лезия – зъбната повърхност е с тебеширено бял/жълтеникав цвят, покрита с плака, без блясък и грапава при сондиране. Клинично не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена в близост до гингивалния ръб.

Код 4: Неактивна, некавитирана лезия – бяла, кафеникава или черна на цвят лезия. Повърхността е твърда, гладка при сондиране, с блясък. Не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена на разстояние от гингивалния ръб.

Първо посещение на пациента:

При първото посещение се извършва клиничен преглед на пациентите и се подписва информирано съгласие за участие в проучването. Оформя се индивидуален картон на пациента, където се регистрират началните кариозни лезии и се определя **стадия** на развитие по ICDAS II, **активността** – по критериите на Nyvad и стойностите на изследваните параметри с КСФ. Определя се степента на кариес-риск за пациента, като се използва инструмент за оценка на кариес риска (*3M ESPE Dental*, Приложение № 1).

Пациентът се инструктира да дъвче парче восък (CRT Paraffin Pellets, *Ivoclar Vivadent*, *Liechtenstein*) за 30 секунди, след което плюе в плювалник. След това продължава да дъвче за още 5 min като изплюва в градуиран контейнер на равни времеви интервали. Нормалното количество на стимулираната слюнка варира между 1 ml/min – 1.6 ml/min. Количества по-малки от 0,7 ml/min са белег за проблеми в слюнчената секреция.

Извършени са мотивация и обучение за правилна орална хигиена и са дадени насоки за съобразен с кариес риска хранителен режим. По време на проучването пациентите използват еднакви пасти (*Elmex, 1400 ppm F*) и четки за зъби (*Elmex Caries Protection 39, medium*), осигурени от докторанта.

Второ клинично посещение:

Подготовка на пациента:

Преди апликацията на реминерализиращите агенти се провежда професионална орална хигиена с полирна четка и паста, без съдържание на флуор Proxylt paste (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*). За изолация на оперативното поле се използва OptraGate (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*).

Изследването се извърши на 45 пациенти със 120 диагностицирани лезии, които се разпределят на случаен принцип по равно ($n=40$) в три групи:

- **Първа група ($n=40$) – Реминерализация със самоорганизиращ се пептид P₁₁-4.**

Протокол на нанасяне на Curodont Repair. Спазва се протоколът, даден от производителя. Зъбът се изолира и подсушава. Бялото петно се третира с натриев хипохлорит (*Cerkamed, Poland*) 2% за 20 секунди, за да се премахне придобитата пеликула. След това се промива с вода и се подсушава. Следва нанасяне на ецващ гел (36% ортофосфорна киселина) за 20 секунди, промиване с вода и подсушаване. Апликаторът, съдържащ Curodont Repair, се активира и мономерният пептид се нанася върху лезията и се оставя за 5 min, за да се абсорбира. Пациентът се инструктира да не приема храна и течности в продължение на един час след процедурата.

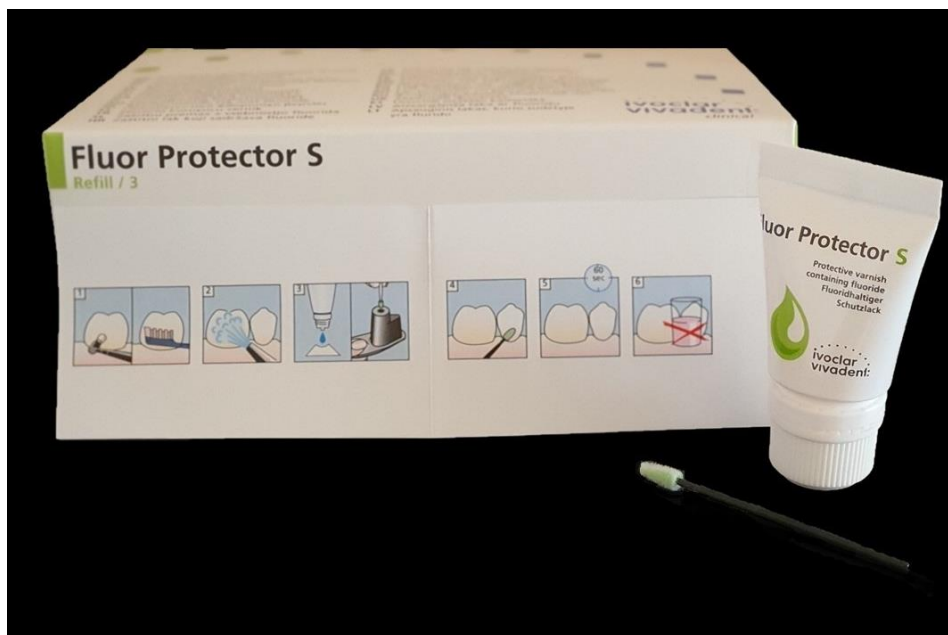
Препаратът се аплицира еднократно в рамките на проучването (12 месеца), съгласно инструкциите на производителя (фиг. 21).



Фиг. 21. Еднократна доза на Curodont Repair, необходима за третирането на една бяла лезия.

- Втора група ($n=40$) – Реминерализация с флуорен лак

Протокол на нанасяне на FluorProtector S: Използва се даденият от производителя протокол (фиг. 22). Зъбът се подсушава, предварително подготвената доза лак се нанася със специален апликатор от системата. Една капка от флуорния лак е достатъчна за третирането на три лезии. Изчаква се една минута до втвърдяването на лака. Пациентът се инструктира да не приема храна и течности в продължение на един час след процедурата. Повторна апликация на лака се извършва на шестия месец от началото на проучването.



Фиг. 22 FluorProtector S и протокол за нансянето му.

- Трета група ($n=40$) – без лечение, контролна.

Контролните прегледи на пациентите са определени на следните времеви интервали – ден 180 и 360, а визитите за ремотивация в орална хигиена на 3 месеца.

За всички участници в проучването е подготвена информация за характера и целта на изследването (Приложение № 2) и карта за информирано съгласие според изискванията на Комисията за етика на научните изследвания при МУ-София (КЕНИМУС) (Приложение № 3).

Провеждането на клиничното изследване и публикуването на резултатите от него са разрешени от КЕНИМУС след експертна етична оценка на методологията и документацията на експеримента с пореден номер №76, вх. 8717/18.12.2020 г.

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

За обработката на данните е използван статистическия пакет IBM SPSS Statistics, v.23.

1. Kruskal-Wallis тест – непараметричен дисперсионен анализ за изследване на зависимости при променливи.

2. За оценка влиянието на принадлежността към дадена група върху резултатите от лечението е приложен дисперсионен анализ. За сравнение на групите по двойки е използван метода на Бонферони.

3. За сравнение на средни при свързани извадки е приложен t-тест за количествените променливи и тест на Willcoxon за ранговите категорийни. При рангови данни само с две категории е приложен и теста на McNemar.

4. Двухфакторен дисперсионен анализ (two-way ANOVA) за установяване кумулативния ефект на два фактора едновременно.

VI. РЕЗУЛТАТИ

По задача 1.

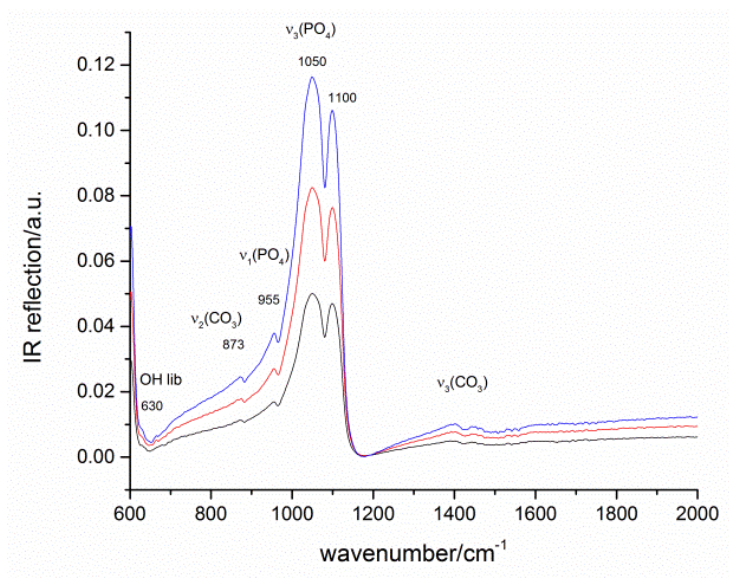
Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.

Резултати, получени при инфрачервена спектроскопия

Резултатите, които получихме, са базирани на измервания от 3 до 7 спектри в различни области от образеца при максимално отражение. При всички недеминерализирани зъбни образци, инфрачервените спектри в режим на отражение на полирани емайлови повърхности показват характерните пикове за карбонат-хидроксилапатит, които се дължат на трептенията на фосфатната група, на карбонатната група и хидроксилната група в кристалната структура. Най-интензивните сигнали в инфрачервените спектри на емайла са характерни за пиковете на несиметрично валентно трептене на фосфатната група $\nu_3(\text{PO}_4)$, които за апатита са в областта около 1050 и 1095 cm^{-1} . Пикът около 870 cm^{-1} е генериран от деформационното трептене на карбонатната група $\nu_2(\text{CO}_3)$. Слабият пик около 957 cm^{-1} е характерен за симетричните трептения на фосфатната група $\nu_1(\text{PO}_4)$, а пиковете в спектралния диапазон 1400 – 1500 cm^{-1} са характерни за несиметричните валентни трептения на карбонатна група $\nu_3(\text{CO}_3)$. Изключение прави само един образец, който има по повърхността друга фосфатна фаза (възможно β -трикалциев фосфат). Пиковете дават информация за наличните по емайловата повърхност молекулни групи. Посочените пикове показват ИЧ характеристики на интактен емайл.

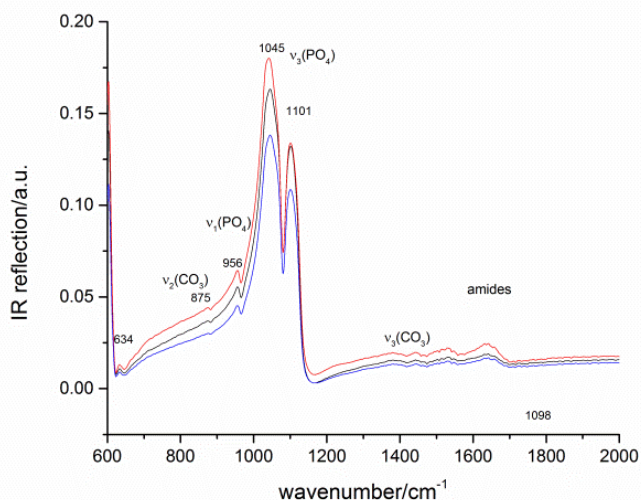
Промяната във вида на наблюдаваните групи или интензитета на пиковете се свързва с изменения по емайловата повърхност. Например понижаването на интензитета на пиковете на фосфатните групи са

индикация за намаляването на минералното съдържимо в емайла. На фиг. 23 е показана ИЧ спектроскопска графика на нетретиран с киселина емайлов образец:



Фиг. 23. ИЧ спектроскопска графика на недеминерализиран образец.

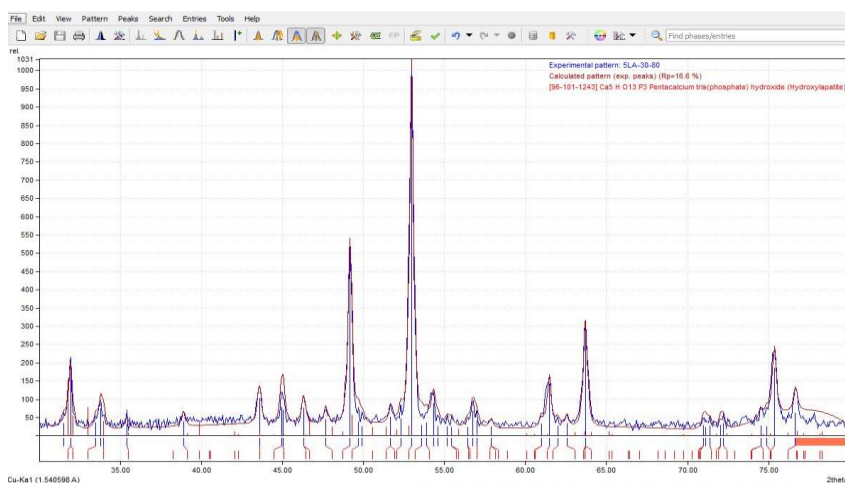
След деминерализацията се наблюдава намаляване на общия интензитет на отразяване, което се дължи на по-голямата поръзност на емайловата повърхност. Забелязва се отместване на пиковете на фосфатната група към по-малки вълнови числа, което се свързва с по-ниска степен на кристалинност на емайловия апатит. Установени са по-добре изразени пикове в областта на карбонатните валентни трептения в диапазона 1380 – 1550 cm^{-1} , което е показател за навлизането в по-дълбоки нива на емайла. На фиг. 24 се вижда също ясно изразен пик в областта на 1650 cm^{-1} , характерен за amidните групи, налични в органичната съставка на емайла.



Фиг. 24. ИЧ спектроскопска графика на деминерализиран образец.

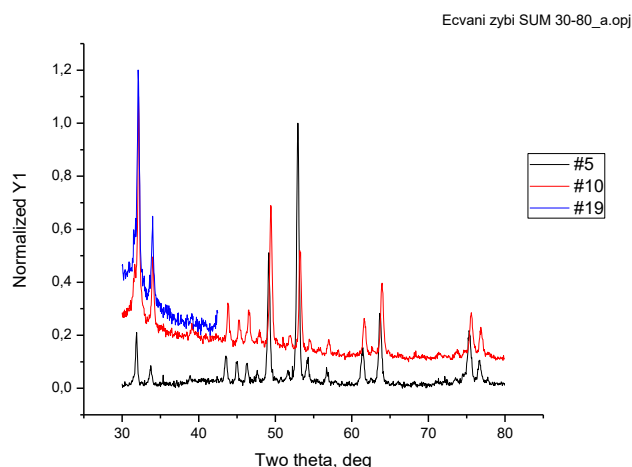
Резултати, получени при рентгено-структурен анализ

Чрез фазов анализ с програмата MATCH 2.0 е определена основната фаза хидроксилапатит на полираните недеминерализирани емайлови образци. Най-вероятната форма е *пентакалциев трифосфат хидроксид* или *хидроксилапатит* с номер по картотеката от дифрактометрични данни 96-101-1243 (фиг. 25). Общата формула е $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$. Средната стойност на размера на кристалитите е 184 Å. Тя е числено определена по формулата на Шерер за добре изразения рефлекс на 64.40 deg 2θ.



Фиг. 25. Дифрактограма и фазов състав на недеминерализиран образец. С червено са отбелязани пиковите на хидроксилапатита с номер 96-101-1243.

Дифрактограмите на зъбните образци, деминерализирани с 0.1 М млечна киселина, показват отлично съответствие помежду си. Наблюдава се еднакъв фазов състав след ецването, с характеристиките на хидроксилапатит. На фиг. 26 са представени дифрактограми на три различни зъбни образци.



Фиг. 26. Дифрактограми на три деминерализирани зъбни образци.

Резултати от изследването на микротвърдост по Vickers

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществява чрез измерването на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайловата повърхност за двете половини на зъбния образец (фиг. 27).



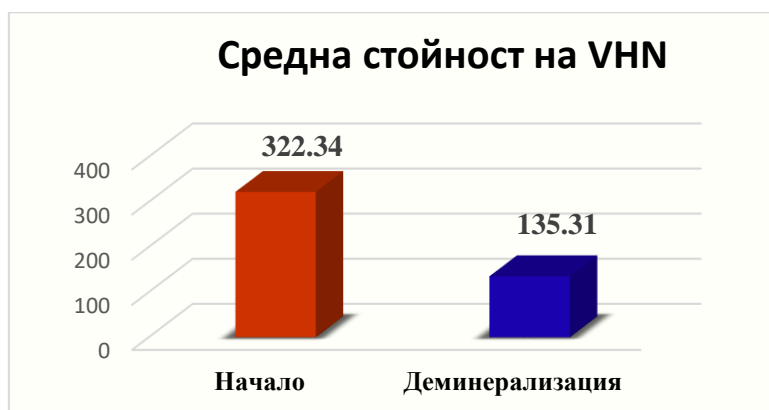
Фиг. 27. Изображение на отпечатъците, които оставя индентора при едно и също увеличение (x40): а) недеминерализирана повърхност; б) деминерализирана повърхност.

Средноаритметичната стойност, получена след измерването на всеки образец, показва микротвърдостта на емайловата повърхност.

Таблица 11. Стойности на микротвърдост (VHN) на емайл в началото и след деминерализация с 0.1 М разтвор млечна киселина

		Mean	N	SD	t	p	Корелация
Pair 1	Начало	322.34	20	11.23	-8,370	0.000	-0.059
	След деминерализация	135.31	20	2,23			

Получените резултати показват, че средната стойност на микротвърдост за нетретирания с киселина зъбна повърхност, е **322.34 ± 11.23**, а след деминерализацията се установиха два пъти по-ниски стойности спрямо изходните – **135.31 ± 2.23** ($p < 0.001$) (фиг. 28).



Фиг. 28. Графика на средните стойности на VHN след 6-дневна деминерализация с разтвор на 0.1 М млечна киселина.

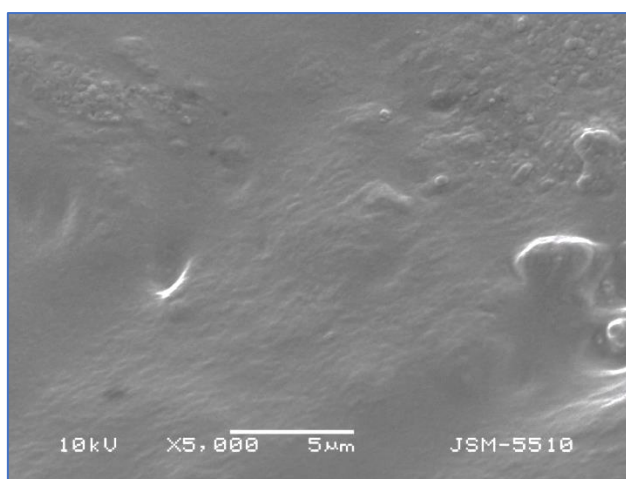
При проведения Т-тест на Стюдънт се измери корелационната зависимост между деминерализираните образци и съответните им контроли. Анализът показва слаба обратнопропорционална зависимост между тях ($R = -0.058$; $0 < R < 0.3$) (табл. 11).

Шестдневното съхранение на образците в 0.1 М разтвор на млечна киселина води до значимо понижаване на стойностите на VHN, свързани с емайловата микротвърдост ($p < 0.001$).

Резултати, получени при СЕМ

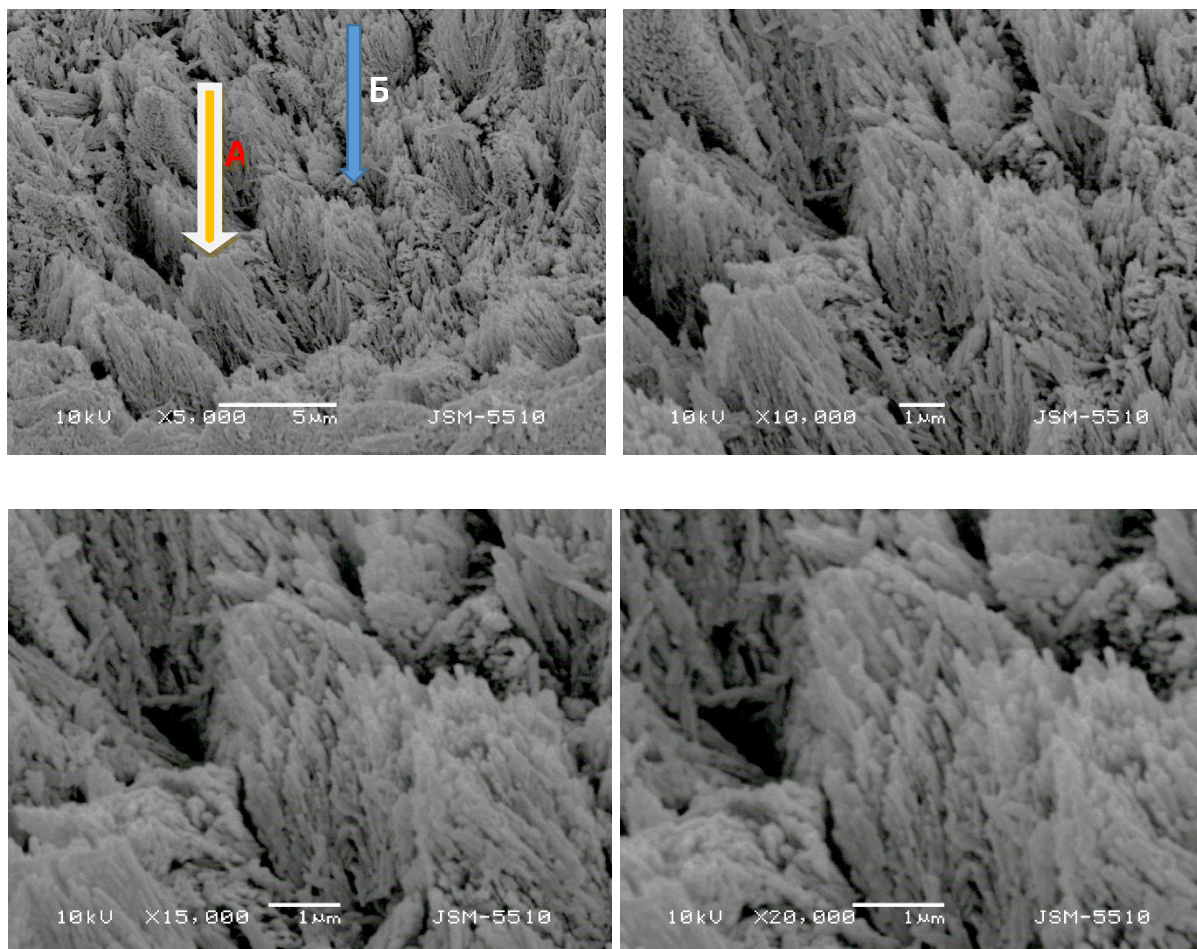
Проведените изследвания чрез СЕМ показват промените, които настъпват в морфологията на емайла след деминерализацията с 0.1 М разтвор на млечна киселина за 6 дни.

Изследването със СЕМ на зъбната половина, която не е третирана с киселина, показва хомогенна, гладка емайлова повърхност (фиг. 29). При някои от образците бяха установени ивици, получени при полирането им.



Фиг. 29. Скенограма на полирана емайлова повърхност, която не е третирана с киселинен буфер (x5000).

След шестдневно третиране 0.1 М разтвор на млечна киселина, емайловата повърхност показва разтваряне на кристалитите в призмените граници и интерпризматичните пространства. Телата на призмите са относително запазени (фиг. 30). При увеличение x20 000 се наблюдава начинът на подреждане и ориентация на остатъчните ХАП кристалити.



Фиг. 30. Скенограма на образец деминерализиран емайл за 6 дни в млечна киселина при нарастващо увеличение: наблюдава се разтваряне предимно в интерпризматичните пространства (Б) и проминиране на телата на призмите (А).

Третирането на емайла с 0.1 М разтвор на млечна киселина води до възникването на изкуствена кариозна лезия, което се доказва с ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ, микротвърдост по Викерс и СЕМ.

По задача 2.

Изследване на реминерализационния потенциал на две полимер-контролирани биомиметични реминерализационни системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.

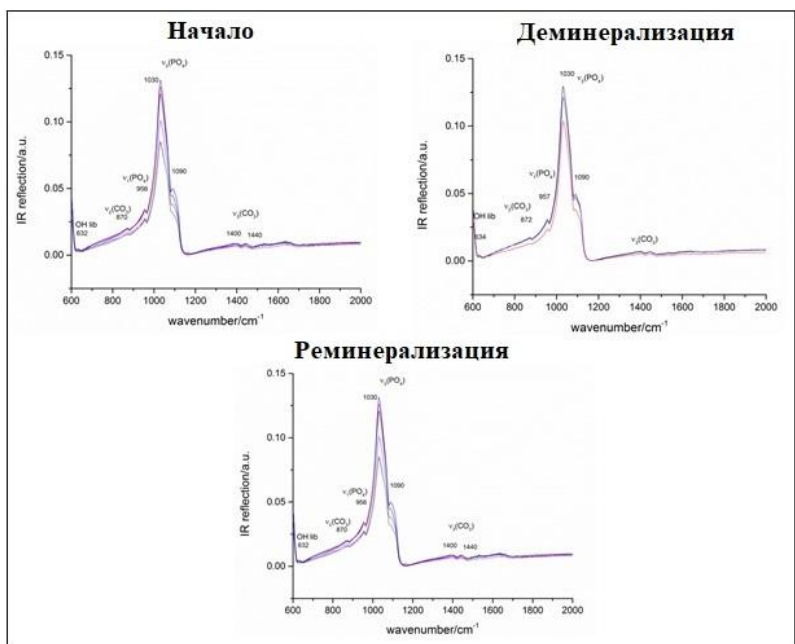
Резултати, получени при инфрачервена спектроскопия

ИЧ спектроскопията определи строежа на молекулата на органичните и неорганичните вещества от приложените системи. Резултатите, които получихме, са базирани на измервания от 3 до 7 спектъра в различни области от образца при максимално отражение или в режим на нарушено пълно вътрешно отражение.

Представени са ИЧ спектрите на един образец от всяка група в следния ред: *начално измерване, деминерализация в млечна киселина и третиране със съответния за групата агент.*

Група 1 (n=20): Изкуствена слюнка

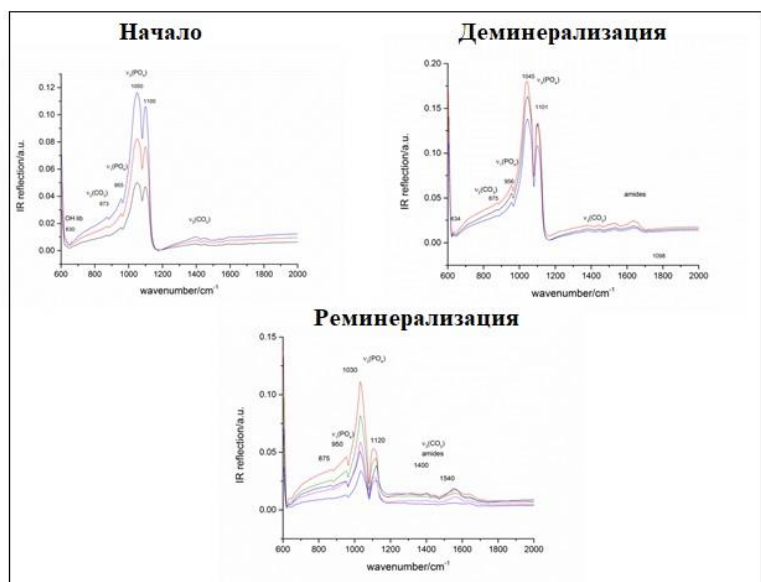
ИЧ спектрите на образците, съхранявани в изкуствена слюнка за 7 дни показват спектри, които са типични за карбонат-хидроксилапатит (фиг. 31). Най-интензивните сигнали са характерни за пиковете на несиметрично валентно трептене на фосфатната група $\nu_3(\text{PO}_4)$, които за апатита са в областта около 1050 и 1095 cm^{-1} . Пикът около 870 cm^{-1} е генериран от деформационното трептене на карбонатната група $\nu_2(\text{CO}_3)$. Слабият пик около 957 cm^{-1} е характерен за симетричните трептения на фосфатната група $\nu_1(\text{PO}_4)$, а пиковете в спектралния диапазон 1400 –1500 cm^{-1} – за несиметричните валентни трептения на карбонатна група $\nu_3(\text{CO}_3)$. Посочените спектри не показват съществени изменения на молекулния състав на емайловата повърхност спрямо резултатите, получени след деминерализирането на емайла.



Фиг. 31. ИЧ спектри на образец, съхраняван в изкуствена слюнка.

Група 2 (n=20): Флуорен гел

Третираният за седем дни с флуорен гел емайл има много нисък интензитет на отражение. Забелязват се добре изразени пикове в областта на карбонатните валентни трептения в диапазона $1380 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ и на амидите при 1650 cm^{-1} (фиг. 32).

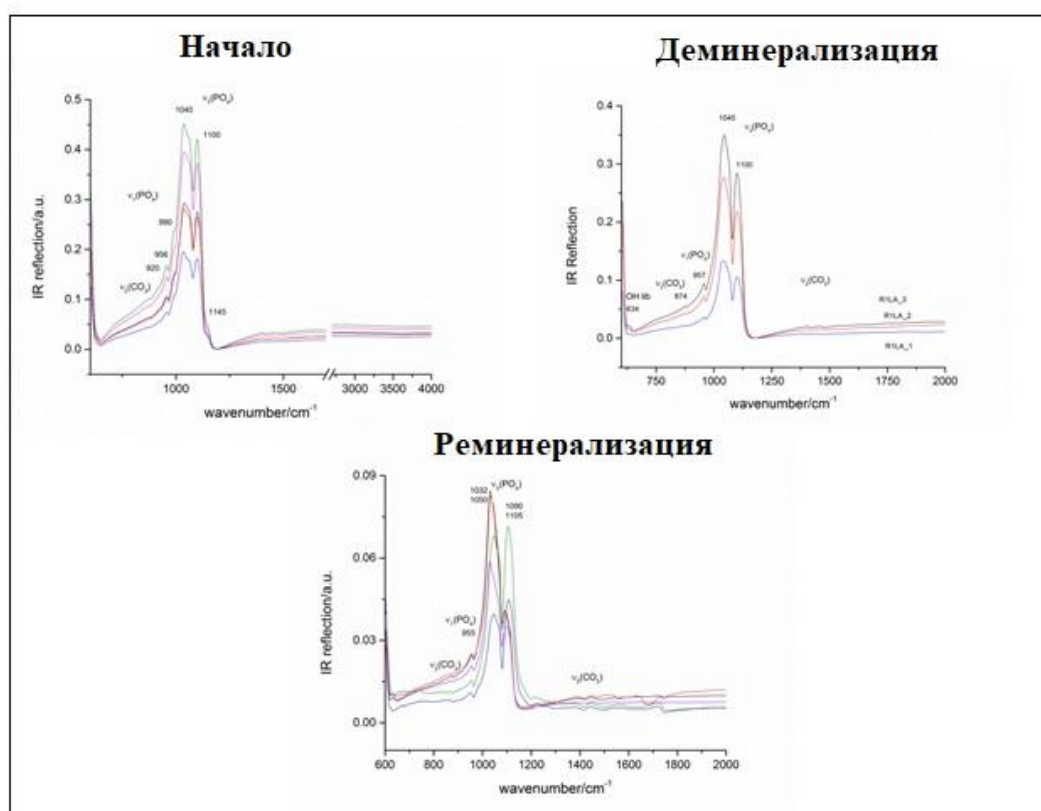


Фиг. 32. ИЧ спектри на емайлов образец след седемдневна апликация на флуорен гел.

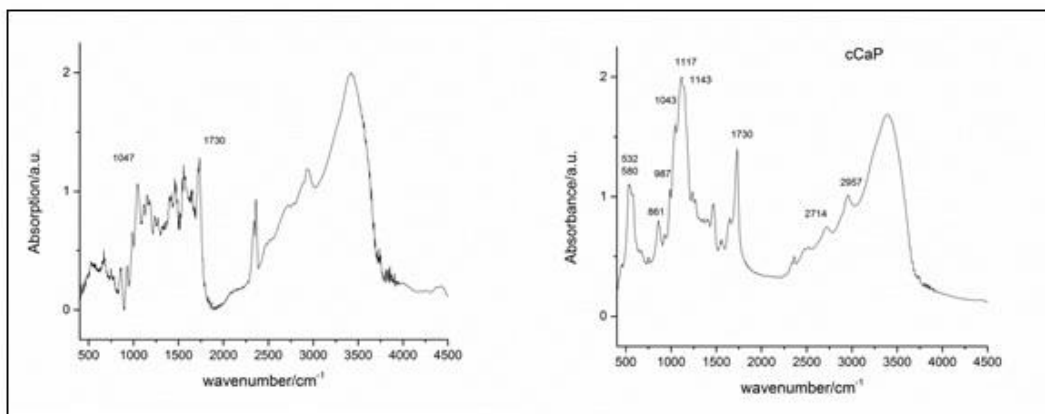
Група 3 (n=20): Полимер-съдържащи системи:

3.1. (n=10) Реминерализация с ПДМЕМА/Carbomer/CaP

В тази група се забелязва отместване на най-интензивните пикове на несиметричните валентни трептения на фосфатната група към 1026 cm^{-1} и 1110 cm^{-1} . Интензитетът на пиковете нараства в областта на фосфатните валентни трептения при $1117 - 1150\text{ cm}^{-1}$, както и при деформационните трептения на фосфатната група ($532-580\text{ cm}^{-1}$) (фиг. 33). Това е индикация за образуване на калциеви фосфати по изследваната повърхност. Възможно е образуването на октакалциев фосфат, който е междинна фаза при формирането на ХАП. Установена е поява на „неапатитни” пикове при 743 , 1226 и 1714 cm^{-1} , характерни за лиофилизираната форма на ПДМАЕМА (фиг. 34). Това показва, че част от полимера се съхранява върху емайловата повърхност дори след промиването на образца с дейонизирана вода.



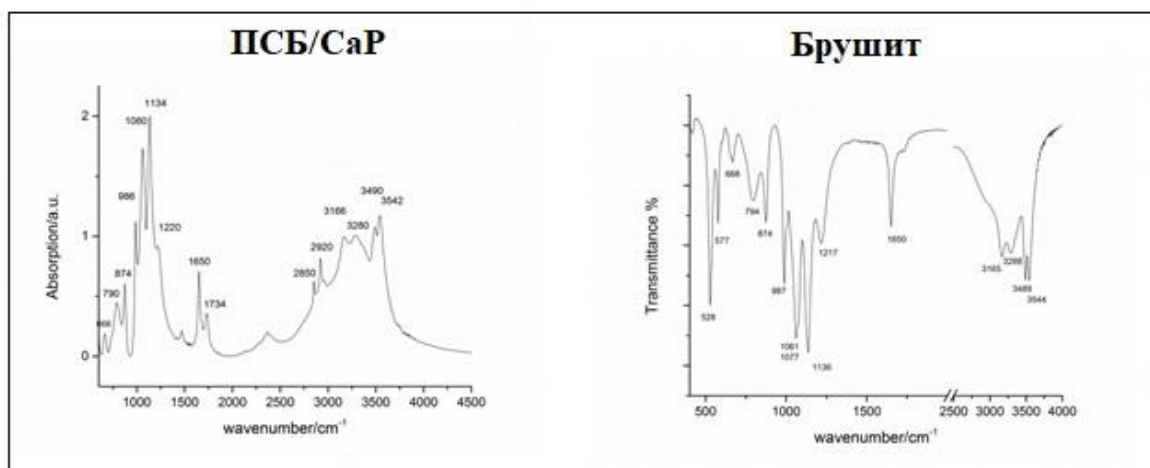
Фиг. 33. ИЧ спектри на образец, третиран с ПДМАЕМА/Карбомер/CaP за седем дни.



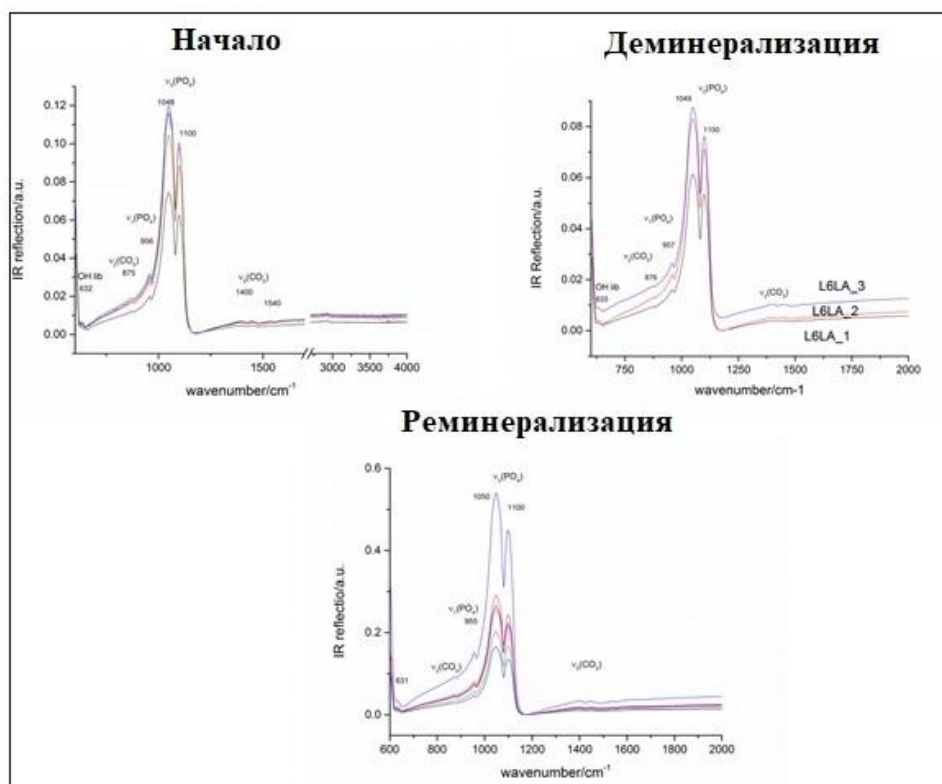
Фиг. 34. ИЧ спектри на лиофилизиран ПДМАЕМА/Карбомер/СаР.

3.2. ($n=10$) Реминерализация с ПСБ/калциеви фосфати:

ИЧ спектри от лиофилизат на реминерализиращата система показаха образуване на дикалциев фосфат дихидрат (брушит) (фиг. 35). В третирания емайл не се регистрира тази фаза. Почти всички спектри съответстват на карбонатхидроксилапатит, който се открива в деминерализирания емайл. Изключение правят два образеца, при които се забелязва характерното за брушит рамо при около 1060 cm^{-1} (фиг. 36). Брушитът е междинна фаза, прекурсор при формирането на ХАП.



Фиг. 35. ИЧ спектър на лиофилизиран ПСБ и референтен спектър на брушит.



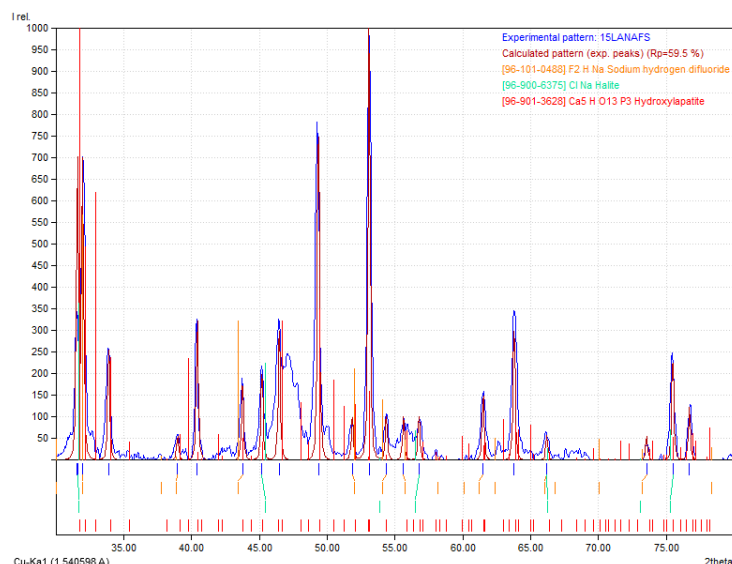
Фиг. 36. ИЧ спектри на образец, третиран с ПСБ/СаР за седем дни.

Резултати, получени при рентгено-структурен анализ

Приложеният метод на рентгенова дифрактометрия се използва за охарактеризиране на фазовия състав на получените калциеви фосфати по емайловите повърхности и изчисляване размера на кристалитите.

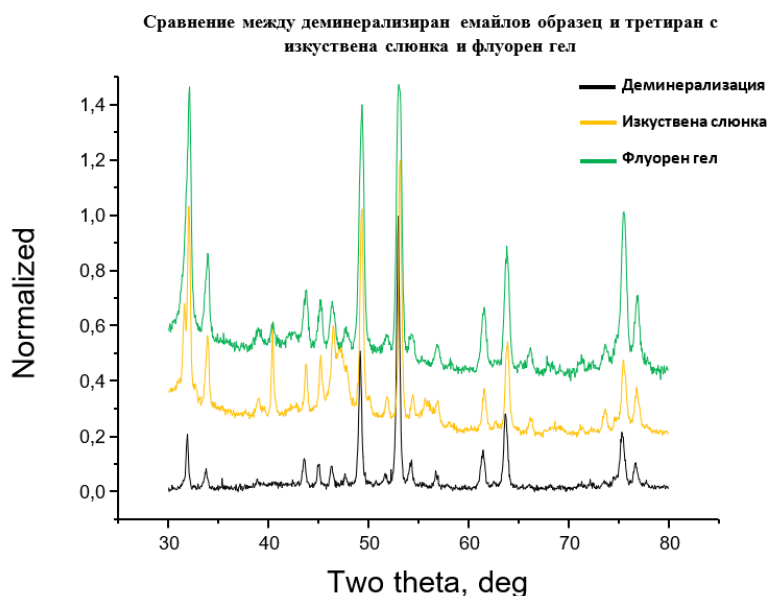
Образци, третирани с изкуствена слюнка и флуорен гел

Чрез фазов анализ с програмата MATCH 2.0 е определена основната фаза хидроксилапатит за третираните с изкуствена слюнка образци. Общата формула е $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$. Номерът по картотеката от дифрактометрични данни е 96-101-1243. Фазовият анализ на третираните с флуорен гел образци показва наличието на хидроксилапатит и NaHF_2 (фиг. 37).



Фиг. 37. Дифрактограма на образец, реминерализиран с флуорен гел. Със синьо е отбелязана експерименталната дифрактограма. За сравнение с червено са отбелязани пиковите на хидроксилапатита с номер 96-101-1243, със зелено – NaCl и с оранжево – NaHF_2 .

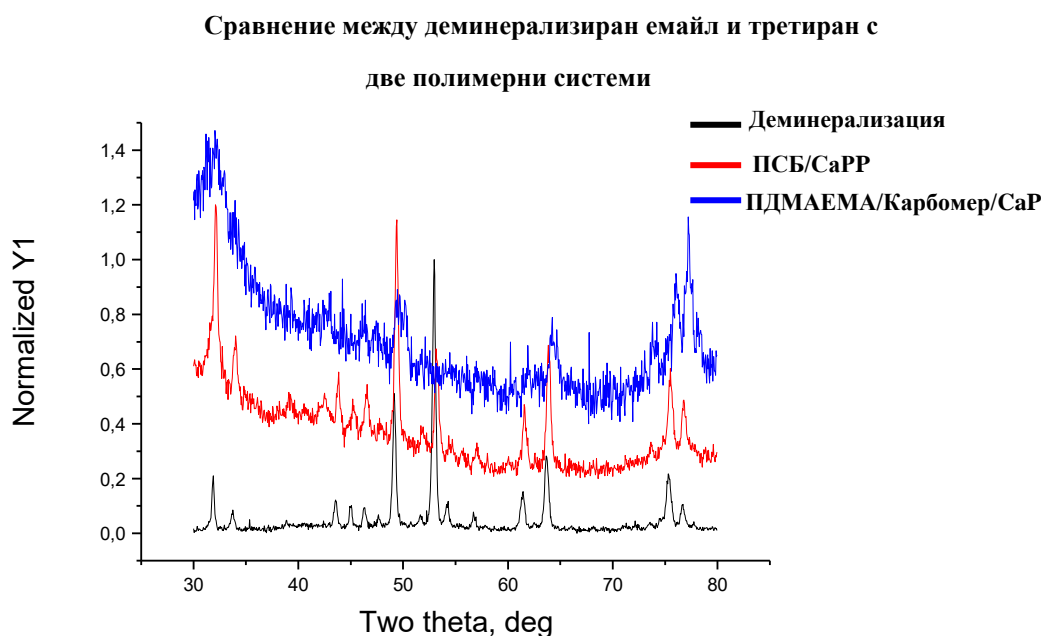
На фиг. 38 е представена сравнителна дифрактограма на деминерализиран и реминерализиран с изкуствена слюнка и флуорен гел емайл. Най-високите и тесни пикове се регистрират в групата с флуорен гел, което е показателно за висока степен на кристалинност на фазите.



Фиг. 38. Дифрактограми на реминализираните с флуорен гел и изкуствена слюнка. За сравнение е показана и рентгенограмата на деминерализиран емайл.

Образци, третирани с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР и ПСБ/СаР

Получените данни сочат, че основната фаза при двете полимерни системи, е хидроксилапатит. Откриват се следи и от друга фаза, която на този етап не може да бъде определена. Дифрактограмите на образците, реминализирани с ПСБ/СаР, имат значително по-широки пикове от тези, реминализирани с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. Това показва, че кристалитите, образувани при първата система, са по-малки от тези във втората (фиг. 39).



Фиг. 39. Дифрактограми на третираните с двете полимерни системи емайлови образци. За сравнение е показана и рентгенограмата на деминерализиран емайл.

Размерът на кристалитите е числено определен по формулата на Шерер за добре изразения рефлекс на 64.40 deg 2 θ . Размерът на кристалитите на реминализираните с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР образци почти съвпада с този на интактния емайл. От друга страна, реминализираните с ПСБ/СаР проби са със значително по-малки кристалити. По-малки размери се наблюдават и в групите с изкуствена

слюнка и флуорен гел (фиг. 40). По-малките по размер кристалити са белег за по-ниска степен на реминерализация на емайловата повърхност.



Фиг. 40. Сравнителна графика между размера на кристалитите, определен по рефлексa на 64.40 deg 2 θ .

Резултати, получени при лазерна флуоресценция

Анализирана е промяната в оптичните качества на емайла след въздействие с различни реминерализиращи средства като ефектът им е сравнен с отрицателната контролна група (изкуствена слюнка). Емайловата повърхност на всеки образец е трикратно изследвана: изходни и стойности, получени след де- и реминерализация. Отчетени са най-високите резултати, получени при всяко измерване като средните им стойности и стандартните отклонения са представени на таблица 12. Междугруповото сравнение на данните се извърши чрез еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) и post hoc Tukey тест. Не се отчете статистически значима разлика в изходните стойности на ЛФ при четирите експериментални групи ($p > 0.05$). При деминерализацията се регистрира повишаване на средните стойности на ЛФ във всички групи като най-висока е в контролната. Статистически значими различия се наблюдаваха между контролната група и третираните с флуорен гел и ПСБ/СаР ($p < 0.05$).

Таблица 12. Лазерна флуоресценция на емайл след въздействие с различни реминерализиращи средства.

Експериментална група	N	Интактна повърхност		Деминерализирана повърхност		Реминерализирана повърхност	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Контролна група ¹	20	6,40	± 1,90	12,10	± 2,27	7,75	± 1,25
Флуорен гел ²	20	5,85	± 1,66	9,90	± 1,55	8,10	± 1,16
ПДМАЕМА/Карбомер /СаР ³	10	6,10	± 1,52	10,40	± 1,78	7,90	± 0,88
ПСБ/СаР ⁴	10	6,80	± 1,40	8,80	± 1,55	7,30	± 1,77
<i>p value</i>		p > 0.05		<p><i>p</i>_{1,2} = 0.002</p> <p><i>p</i>_{1,3} = 0.097</p> <p><i>p</i>_{1,4} < 0.001</p> <p><i>p</i>_{3,4} = 0.230</p>		p > 0.05	

* Статистически значими стойности са отчетени при $p < 0.05$. С червен цвят са маркирани групите, между които се установява статистически значима разлика.

Независимо от понижаването на стойностите на ЛФ след реминерализация спрямо деминерализация, не се установиха статистически значими различия между четирите изследвани групи.

Проследена е динамиката в промяната на стойностите на ЛФ при интактна, деминерализирана и реминерализирана емайлска повърхност във всяка една от групите (табл. 13). Приложен е Paired Samples T – тест за вътрегрупово сравнение.

Таблица 13. Вътрегрупово сравнение на стойностите на лазерна флуоресценция на емайл след въздействие с различни реминерализиращи средства.

Експериментална група	Контролна група (n = 20)		Флуорен гел (n = 20)		ПДМАЕМА/ Карбомер/СаР (n = 10)		ПСБ/СаР (n = 10)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Интактна повърхност ¹	6,40	± 1,90	5,85	± 1,66	6,10	± 1,52	6,80	± 1,40
Деминерализирана повърхност ²	12,10	± 2,27	9,90	± 1,55	10,40	± 1,78	8,80	± 1,55
Реминерализирана повърхност ³	7,75	± 1,25	8,10	± 1,16	7,90	± 0,88	7,30	± 1,77
<i>p value</i>	p_{1,2} < 0.001 p_{1,3} = 0.033 p_{2,3} < 0.001		p_{1,2} < 0.001 p_{1,3} < 0.001 p_{2,3} = 0.001		p_{1,2} < 0.001 p_{1,3} = 0.019 p_{2,3} = 0.005		p_{1,2} = 0.017 p_{1,3} = 0.544 p_{2,3} = 0.067	
<i>t</i>	t _{1,2} = -8.371 t _{1,3} = -2.303 t _{2,3} = 8.293		t _{1,2} = -7.063 t _{1,3} = -5.493 t _{2,3} = 3.994		t _{1,2} = -5.763 t _{1,3} = -2.862 t _{2,3} = 3.727		t _{1,2} = -2.928 t _{1,3} = -0.631 t _{2,3} = 2.087	

* Статистически значими стойности са отчетени при $p < 0.05$. С червен цвят са маркирани статистически значимите различия.

Промяната в средните стойности на ЛФ в четирите експериментални групи е, както следва: интактна < реминерализирана < деминерализирана повърхност. Статистически значими са различията, наблюдавани в контролната група и третираните с флуорен гел и ПДМАЕМА/Карбомер/СаР образци ($p < 0.05$). Реминерализацията на емйловите повърхности с ПСБ/СаР доведе до несъществено понижаване на стойностите на ЛФ спрямо отчетените след деминерализацията им ($p > 0.05$).

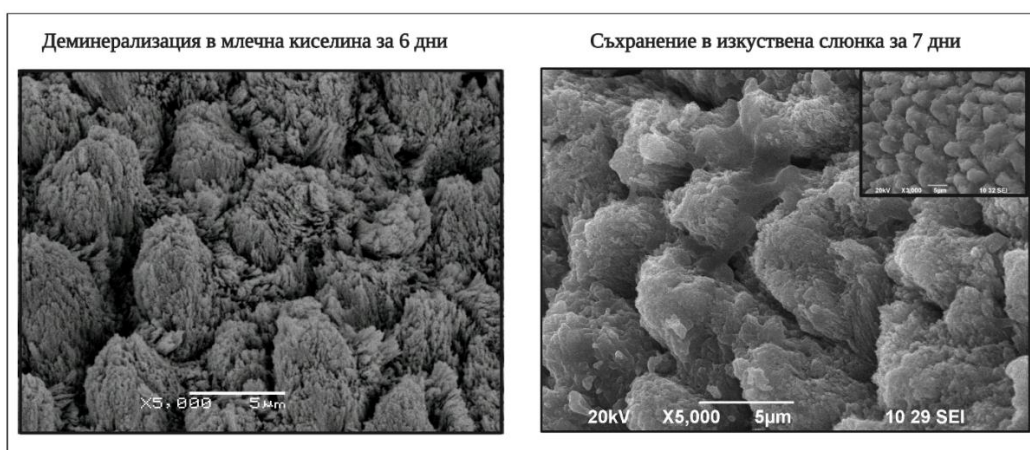
Резултати, получени при СЕМ

Промяната в повърхностната морфология на емайла след приложението на реминерализиращите средства се оцени чрез СЕМ. За

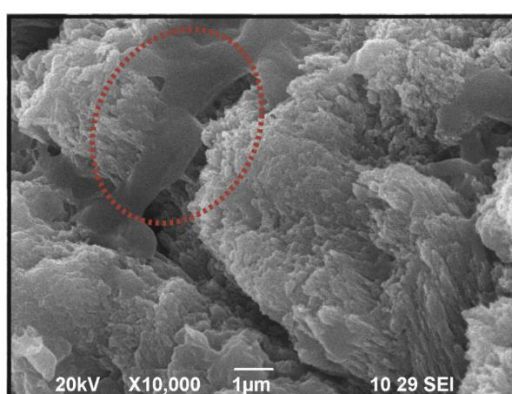
сравнение служат скенограмите от деминерализираните половини на зъбния образец.

Група 1 ($n=20$): Изкуствена слюнка

Скенограмите показват, че структурата на емайла, получена при деминерализацията, е запазена, но се наблюдава леко заглаждане в очертанията на емайловите призми (фиг. 41). При някои от образците се забелязва наличие на хомогенни повлекла, вероятно от органичната съставка на слюнката. Те са разположени в интерпризматичните пространства (фиг. 42).



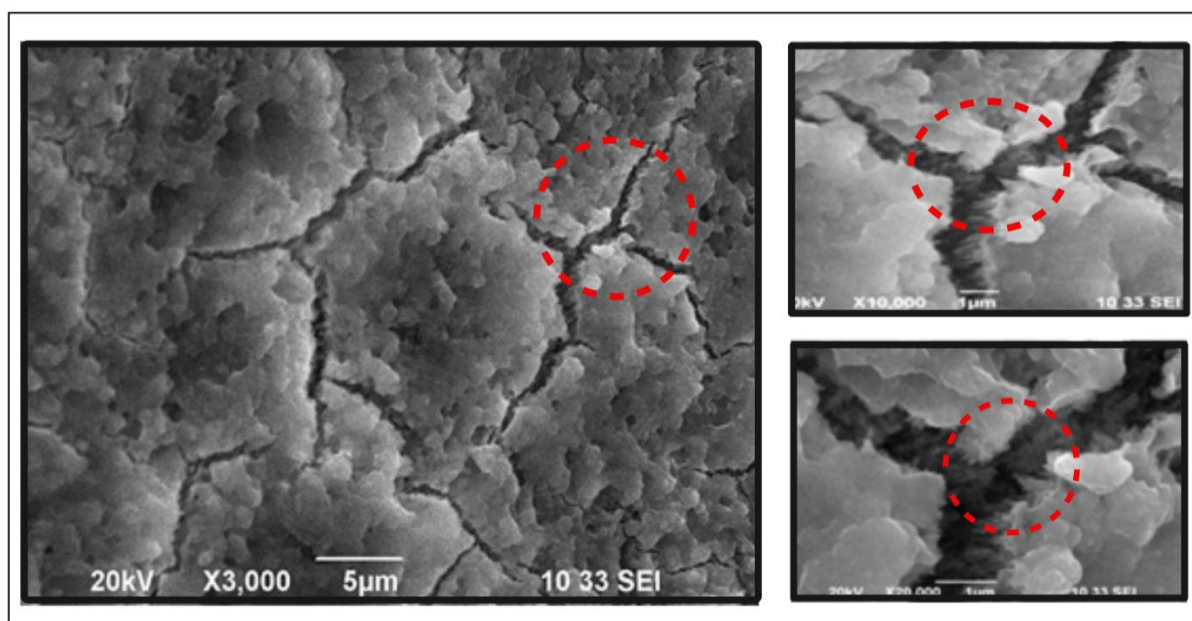
Фиг. 41. Скенограми на двете симетрични половини на един емайлов образец (x5000).



Фиг. 42. Скенограма на емайлов образец, съхраняван в изкуствена слюнка. С червен кръг е отбелязано повлекло, разположено в интерпризматична зона.

Група 2 ($n=20$): Флуорен гел

Скенограмите след седемдневно аплициране на флуорен гел показват образуването на стабилен минерален слой. Той плътно покрива откритите зони на емайловите призми. Прави впечатление, че новообразуваният слой е разположен предимно в центъра на призмите, докато интерпризматичните пространства не са ангажирани (фиг. 43).



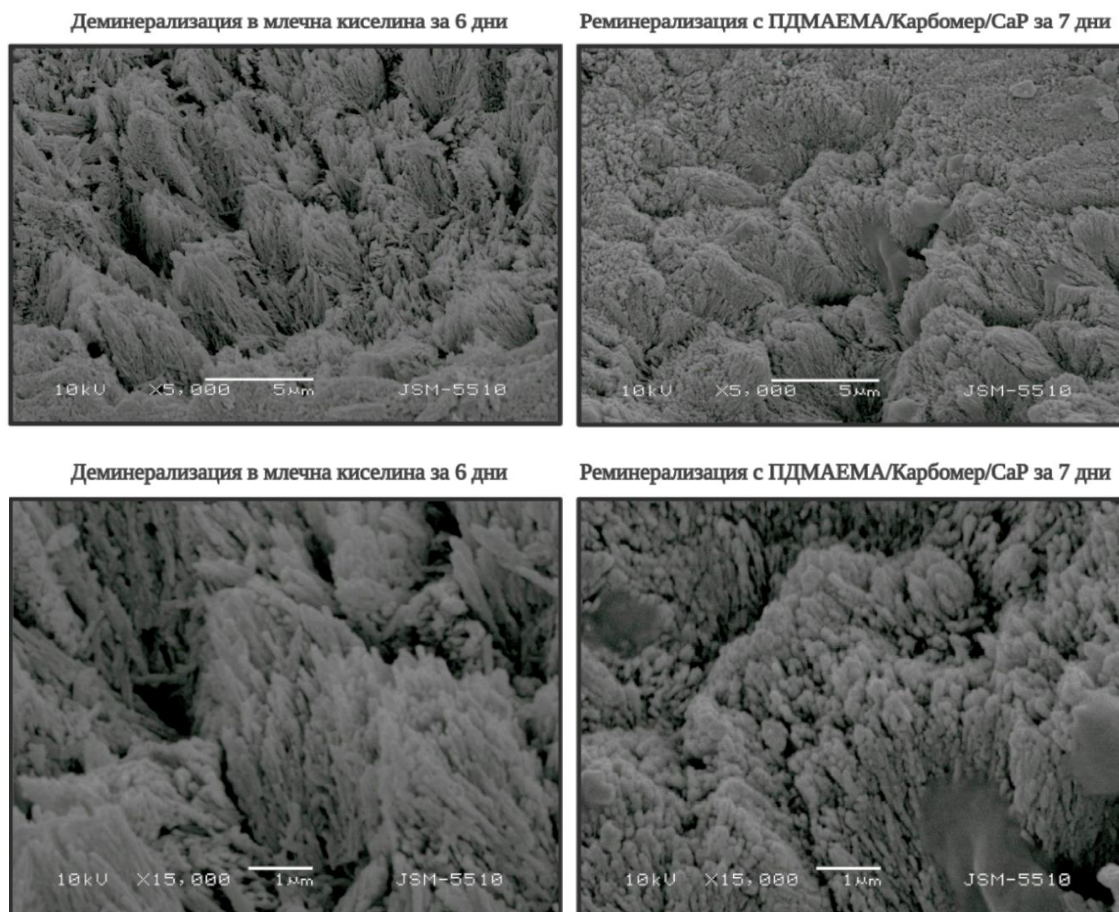
Фиг. 43. Скенограми с нарастващи увеличения ($\times 3000$, $\times 10000$, $\times 20000$) на емайл, третиран с флуорен гел за 7 дни. С червен кръг са отбелязани свободните от минерализиран слой интерпризматични зони.

Група 3 ($n=20$): Реминерализация с две полимер-съдържащи системи:

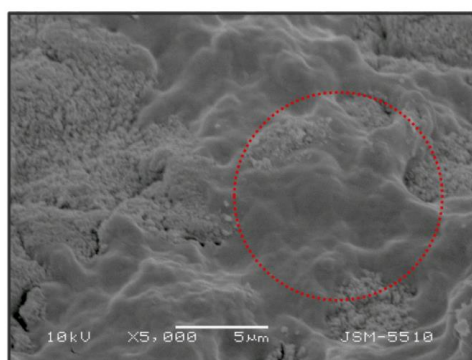
3.1. Реминерализация с ПДМЕМА/Carbomer/CaP

Скенограмите на деминерализираните симетрични половини показват игловидна, остра форма на остатъчните след деминерализацията кристалити. Засегнати са предимно интерпризматичните пространства, а телата на призмите са запазени. При апликацията на ПДМЕМА/Карбомер/CaP се установява нарастването на нанокристалитите във фронта на разтварянето на емайловите призми.

Ориентация на новообразуваните кристалици наподобява тази в емайловите призми (фиг. 44). В някои от образците се забелязва хомогенна, гладка структура, която покрива участъци от емайловата повърхност, разположени в близост до зони на реминерализация (фиг. 45).



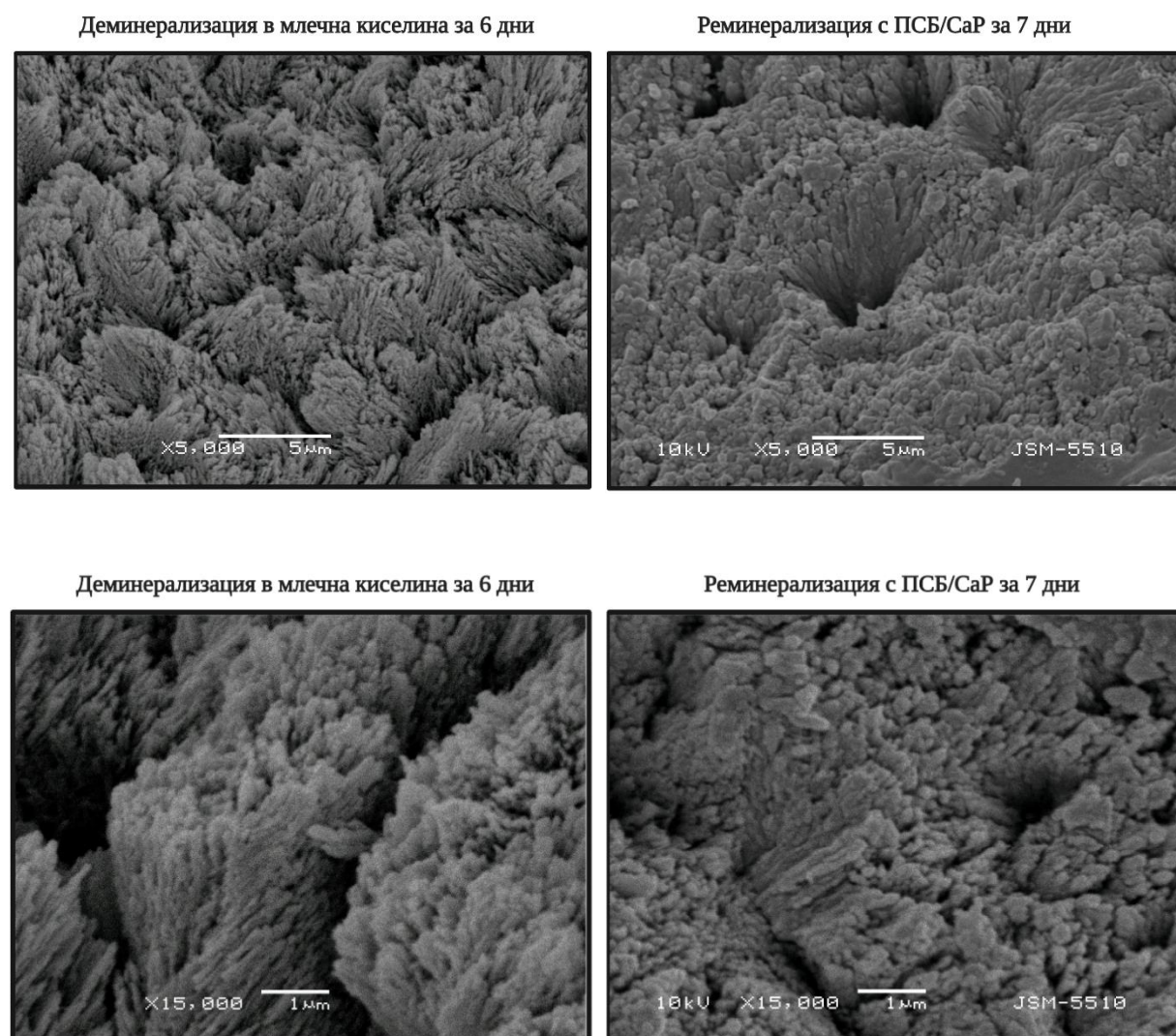
Фиг. 44 Скенограма на емайл, третиран с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР (x5000, x15 000).



Фиг. 45. Скенограма на емайл, третиран с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. В червен кръг е отбелязана хомогенната гладка структура, разположена в близост до зони на нарастване на нанокристалитите.

3.2. ($n=10$) Реминерализация с (ПСБ/калциеви фосфати):

Седемдневната апликация на ПСБ/СаР води до заличаване на очертанията на емайловите призми. Наличен е равномерно минерализиран повърхностен слой със зърниста структура. Въпреки че той е богат на нанокристали, не се наблюдава ориентирана кристализация (фиг. 46).



Фиг. 46. Скенограми на симетрични половици от емайлови образци след де- и реминерализация с ПСБ/СаР (x5000, x15 000).

Чрез ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ, ЛФ и СЕМ се установи, че апробираните реминерализиращи полимерни системи водят до

промяна в молекулния, фазовия състав и морфологията на емайловата повърхност след седемдневен период на въздействие върху изкуствените кариозни лезии.

По подзадача 2.1.

Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализационна система (ПДМАЕМА/ Карбомер/ СаР).

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществи чрез измерването в μm на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайловата повърхност. Използва се формулата, посочена в задача 1. Средноаритметичната стойност, получена след петкратното измерване на всеки образец, показва микротвърдостта на емайловата повърхност. Сравнени са стойностите за микротвърдост, отчетени при изходното състояние, след деминерализация и последваща реминерализация на образците (табл. 14).

Таблица 14. Стойности на микротвърдост (VHN) на емайл в началото, след деминерализация и реминерализация с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР за седем дни.

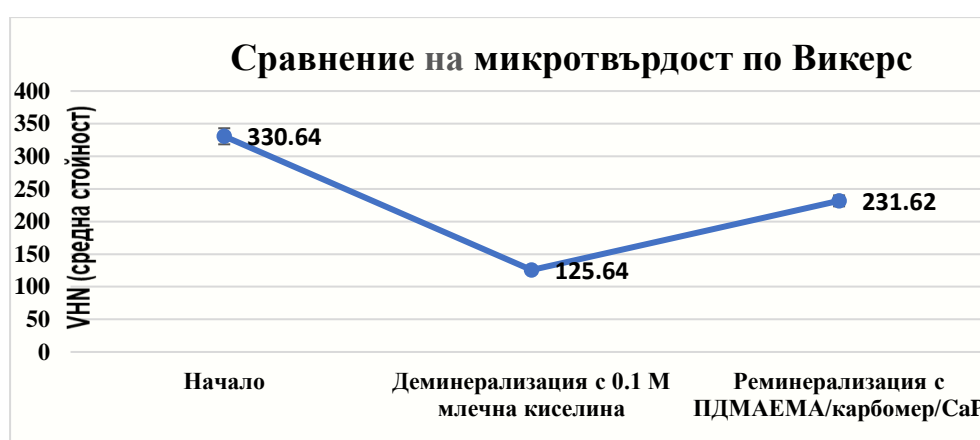
		Mean	N	SD	t	p	Корелация
Pair 1	Начало	330,64	30	12,32	-8,371	0.000	-0.059
	Деминерализация	125,64	30	2,41			
Pair 2	Начало	330,64	30	12,32	-2,303	0.029	-0.354
	Реминерализация	231,62	30	8,35			
Pair 3	Деминерализация	125,64	30	2,41	8.293	0.000	0.313
	Реминерализация	231,62	30	8,35			

Корелационният анализ показва умерена обратнопропорционална зависимост между VHN при интактна повърхност и след реминерализацията $/R=-0.3537; 0.3 < R < 0.5/$.

Отчетена е статистически значима връзка между стойностите, измерени при деминерализация и тези след реминерализация с ПДМАЕМА/

Карбомер/ СаР чрез измерване на умерена правопрпорционална зависимост.

Получените резултати показват, че средната стойност на VHN за интактна зъбна повърхност е 330.64 ± 12.32 , а след деминерализацията се установява двукратно ѝ понижаване – 125.64 ± 2.41 ($p < 0.001$). След седмдневно нанасяне на реминерализиращия агент тези стойности нарастват със 70 % до 231.62 ± 8.35 , като разликата е статистически значима ($p < 0.001$) (фиг. 47).



Фиг. 47. Графика на средните стойности и стандартните отклонения на VHN на изследваните образци.

Статистически значимото повишаване на стойностите за микротвърдост (VHN) ($p < 0,001$) е показателно за подобряването на механичните качества на емайла след прилагането на ПДМАЕМА/Карбомер/СаР за седем дни.

По задача 3.

In vitro изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P11-4.

Микротвърдост по Викерс

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществява чрез измерването на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайловата повърхност. Измерванията се извършват в три момента – в началото, след деминерализацията и след реминерализацията за трите изследвани периода на съхранение в изкуствена слюнка – 1, 4 и 8 седмици.

Таблица 15. Средни стойности на микротвърдост (VHN) на емайла при изследваните групи.

	Интактен емайл	Демин.	Ремин. 1 седмица	Ремин. 4 седмици	Ремин. 8 седмици	<i>P</i>
Изкуствена слюнка	334.5 ±20.50 ^{A, a}	138.40 ±13.67 ^{A, b}	148.90 ±11.31 ^{A, c}	159.20 ±16.42 ^{A, d}	170.60 ±16.43 ^{A, e}	<i>p</i> <0.05
FluorProtector S	343.10 ±10.84 ^{A, a}	132.80 ±9.03 ^{A, b}	211.30 ±19.37 ^{B, c}	249.20 ±13.45 ^{B, d}	300.80 ±14.69 ^{B, e}	<i>p</i> <0.05
P11-4	343.10 ±20.89 ^{A, a}	135.60 ±13.40 ^{A, b}	229.20 ±13.78 ^{C, c}	294.60 ±19.21 ^{C, d}	317.30 ±11.39 ^{C, e}	<i>p</i> <0.05
<i>p</i>	<i>p</i> >0.05	<i>p</i> >0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> <0.05	

* С различни малки букви са обозначени статистически значимите стойности във всеки ред. С различни главни букви са представени статистически значимите стойности във всяка колона. Статистическа значимост се отчита при *p*<0.05.

Разликите в стойностите за микротвърдост между интактен емайл, след деминерализация и трите изследвани периода на въздействие са статистически значими и при трите изследвани групи (*p*<0.05).

Не се регистрираха съществени различия между средните стойности на VHN за интактен и деминерализиран емайл между трите групи. Използваните реминерализиращи средства (P₁₁₋₄ и FluorProtector S) съществено повишават микротвърдостта на емайловата повърхност спрямо отрицателната контролна група. P₁₁₋₄ повишава значимо микротвърдостта на емайловата повърхност и при трите периода на въздействие в сравнение с резултатите, отчетени след реминерализацията с FluorProtector S (табл. 15).

За да се оцени взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху емайловата микротвърдост (VHN) се приложи двуфакторен дисперсионен анализ (табл. 16).

Таблица 16. Оценка на взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху стойностите на емайлова микротвърдост (VHN).

	<i>Type III Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
Реминерализираща терапия	149307.573	2	74653.787	315.409	p<0.05
Време	696363.293	4	174090.823	735.526	p<0.05
Взаимодействие на терапия и време	111014.827	8	13876.853	58.629	p<0.05

* Статистическа значимост се отчете при p<0.05.

Двуфакторният дисперсионен анализ (two-way ANOVA) разкри, че комбинираното влияние на факторите *време на реминерализация* и *вид на използваното средство*, оказват статистически значим ефект върху промяната на VHN. Това е индикация, че по-продължителното съхранение на образците в разтвор на изкуствена слюнка потенцира реминерализиращия ефект, настъпващ в емайла, което води до подобряване на механичните качества на емайла.

Количествена светлинна флуоресценция

Използваният метод на КСФ оцени минералната загуба в емайла чрез промяна в излъчената флуоресценция. Параметрите, които оценихме са : ΔQ – обем на лезията и ΔF – дълбочина на лезията. Регистрираните числени стойности са с отрицателен знак и показват загубата на флуоресценция. Повишаването им е индикация за редуцирането на обема и дълбочината на лезията.

Приложихме КСФ за всеки емайлов образец в следните етапи – в началото, след деминерализацията и след реминерализацията за трите изследвани периода – 1, 4 и 8 седмици.

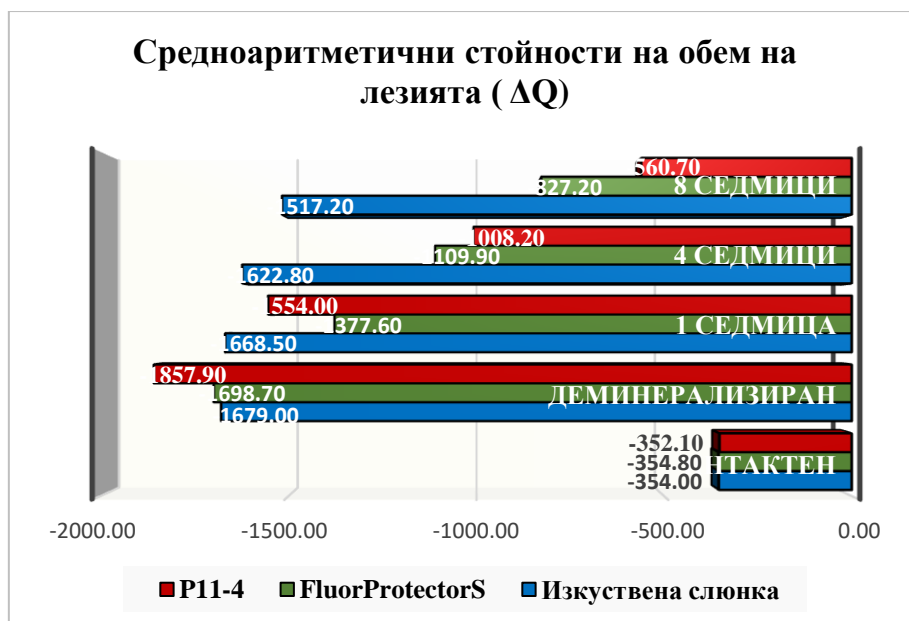
Таблица 17. Средни стойности на ΔQ на емайла при изследваните групи в отделните етапи на експеримента.

ΔQ	Интактен емайл	Демин.	Ремин. 1 седмица	Ремин. 4 седмици	Ремин. 8 седмици	<i>P</i>
Изкуствена слюнка	-354 ± 112.25 a	- 1679 ± 490.47 b	-1668.50 ± 487.35 c	-1622.8± 484.58 A d	- 1517.20 ± 491.86 A e	p<0.05
FluorProtector S	-354.80 ± 150.76 a	-1698.7 ± 574.64 b	- 1377.60 ± 447.98 c	-1109.9 ± 294.25 B d	-827.20 ± 180.96 B e	p<0.05
P₁₁₋₄	-352.10± 148.68 a	-1857.9± 785.72 b	-1554± 593.29 c	-1008.20± 350.47 B d	-560.70± 166 B e	p<0.05
<i>P</i>	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05	

*Статистическа значимост се отчете при $p<0.05$. С различни главни букви по колони се отбелязва статистически значимите разлики. С различни малки букви по редове се отбелязва статистически значимите разлики.

P_{11-4} и флуорният лак значително редуцират обема на емайловата лезия в сравнение с отрицателната контролна група ($p<0.05$) на 4-та и 8-ма седмица, като разликите между тях са несъществени ($p>0.05$) (табл. 17).

На фиг. 48 са представени средноаритметичните стойности на ΔQ при трите групи по време на експеримента (фиг. 48).



Фиг. 48. Разпределение на средноаритметичните стойности на ΔQ в трите групи през отделните етапи на експеримента.

След прилагането на реминерализиращите вещества се установи постепенно повишаване на средните стойности на ΔQ (редуциране на обема на лезията) за трите периода като най-значително влияние оказва P11-4.

За да се оцени взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху обема на лезията (ΔQ), се приложи двуфакторен дисперсионен анализ (табл. 18).

Таблица 18. Оценка на взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху обема на лезията, измерен чрез КСФ.

	<i>Type III Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
Реминерализираща терапия	2965155.293	2	1482577.647	7.993	p<0.05
Време	35277706.827	4	8819426.707	47.549	p<0.05
Взаимодействие на терапия и време	4700699.573	8	587587.447	3.168	p<0.05

* Статистическа значимост се отчете при p<0.05.

Двуфакторният дисперсионен анализ (two-way ANOVA) разкри, че времето и реминерализиращото средство имат статистическо влияние върху ΔQ (обема на лезията). По-продължителното съхранение на образците в разтвор на изкуствена слюнка води до съществено редуциране на обема на лезията.

Промените в дълбочината на лезията ΔF след трите времеви интервала в изследваните групи са представени на таблица 19.

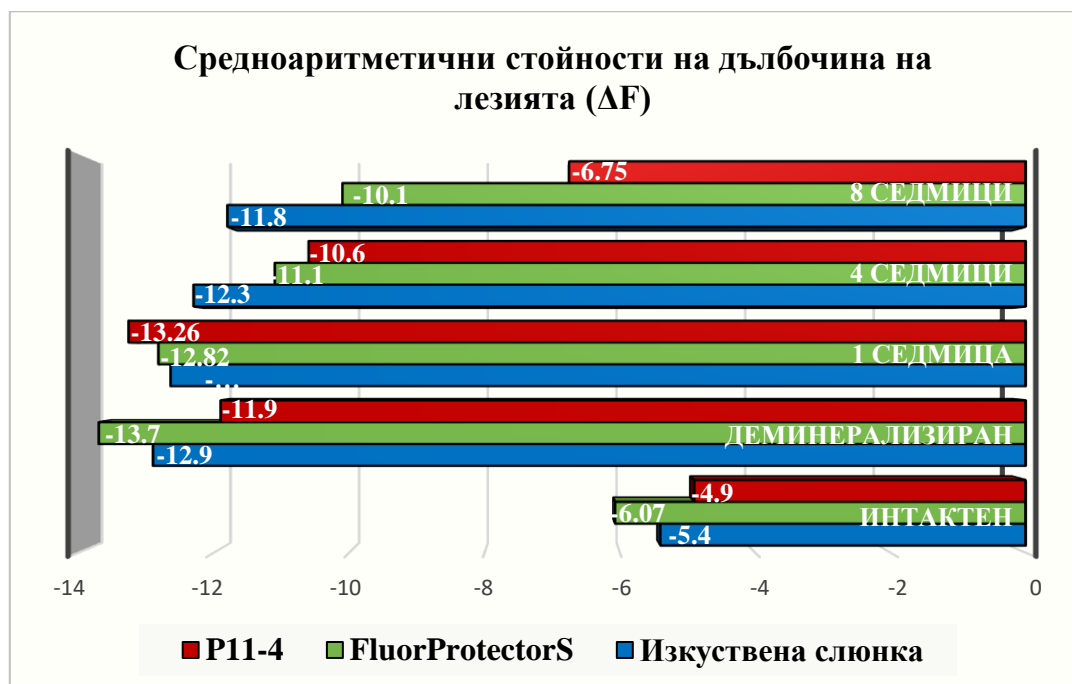
Таблица 19. Средни стойности на ΔF на емайла между изследваните групи в отделните етапи на експеримента.

ΔF	Интактен емайл	Демин.	Ремин. 1 седмица	Ремин. 4 седмици	Ремин. 8 седмици	<i>P</i>
Изкуствена слюнка	-5.04 ± 1.034 a	-12.95 ± 2.037 b	-12.64 ± 2.139 c	-12.3 ± 2.16 A d	-11.81 ± 2.16 A e	p<0.05
FluorProtector S	-6.07 ± 1.44 A a	-13.71 ± 1.30 b	-12.82 ± 1.38 c	-11.1 ± 1.42 d	-10.13± 1.31 B e	p<0.05
P₁₁-4	-4.09 ± 1.029 B a	-11.06 ± 9.47 b	- 13.26 ± 1.39 b c	-10.66 ± 1.05 B b d	-6.75± 0.87 C b e	p<0.05
<i>p</i>	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05	

*Статистическа значимост се отчете при $p<0.05$. С различни главни букви по колони се отбелязаха статистически значимите разлики. С различни малки букви по редове се отбелязаха статистически значимите разлики.

Анализът на получените резултати показва, че приложението на P₁₁-4 след 8-седмично съхранение в изкуствена слюнка води до статистически значимо намаляване на дълбочината на лезията (ΔF) спрямо отрицателната контролна група ($p=0.002$) и тази, подложена на реминерализация с флуор ($p=0.006$) за същия период. Въпреки че флуорният лак води до намаляване на ΔF за 4 седмици, получените стойности не се различават съществено от тези, отчетени при контролната група ($p=0.751$). На четириседмичния

период не се установи статистически значима разлика между P11-4 и флуорния лак (фиг. 49).



Фиг. 49. Средноаритметични стойности на ΔF при трите групи, отчетени в отделните етапи на експеримента.

След прилагането на реминерализиращите вещества се установи постепенно повишаване на средните стойности на ΔF (намаляване на дълбочината на лезията) за трите периода като най-високите стойности се регистрираха в групата на P11-4. Най-висока средна стойност се регистрира на осмата седмица, като разликите спрямо 1- и 4-седмичен период са статистически значими.

За да се оцени взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху дълбочината на лезията (ΔF) се приложи двуфакторен дисперсионен анализ.

Таблица 20. Оценка на взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху дълбочината на лезията, измерена чрез КСФ.

	<i>Type III Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
Реминерализираща терапия	96.370	2	48.185	5.876	p<0.05
Време	1230.074	4	307.518	37.499	p<0.05
Взаимодействие на терапия и време	109.764	8	13.720	1.673	p>0.05

* Статистическа значимост се отчете при $p<0.05$.

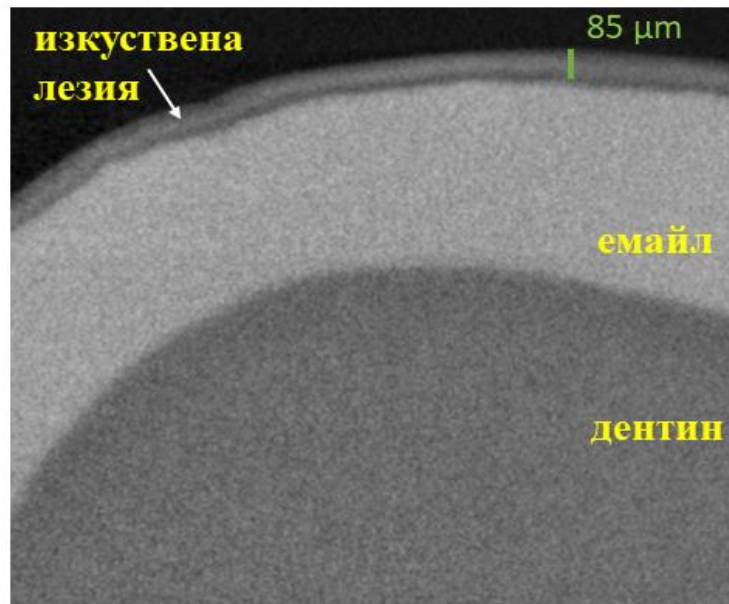
Проведеният анализ установи, че кумулативният ефект на времето и реминерализиращото вещество не влияе върху дълбочината на лезията, измерена с КСФ ($p>0.05$) (табл. 20).

Компютърна микротомография

За изчисляването на промяната в минералната плътност на емайла (g/cm^3) като резултат от реминерализиращата терапия е използван линеен коефициент на отслабване (ЛКО). Понижаването на ЛКО се свързва с по-голяма транспарентност на емайла и намаляване на минералното съдържимо, докато по-високите числени стойности са определени от по-високата минерална плътност.

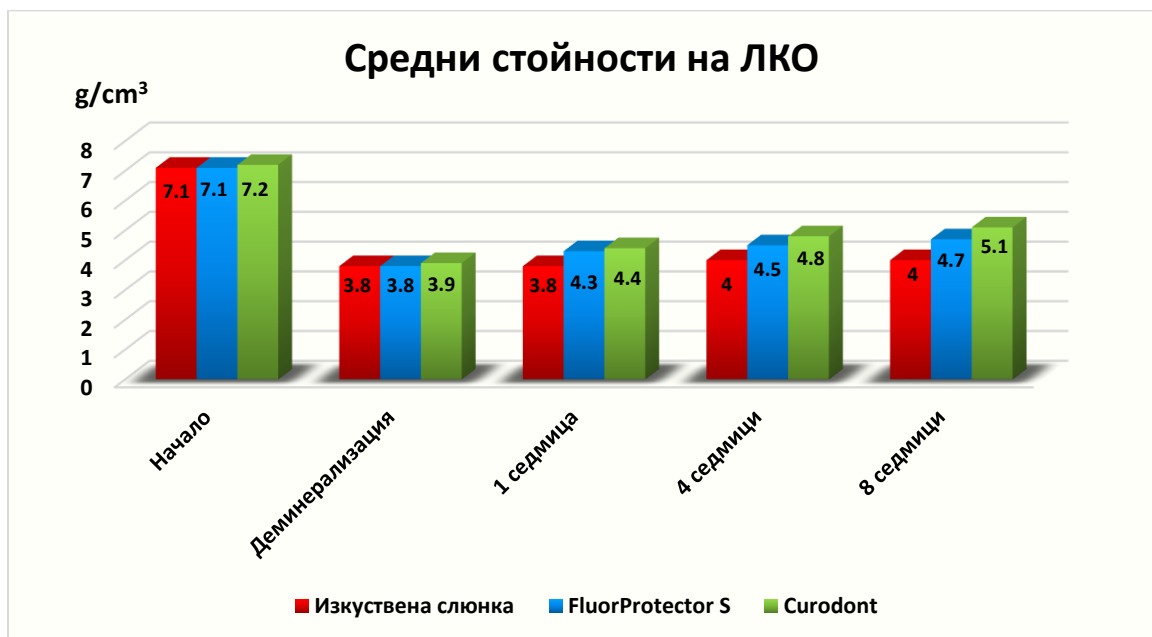
КМТ изследване допълни информацията за получените изкуствени кариозни лезии. След деминерализацията с млечно-киселинния буфер за 6 дни се наблюдава ясно изразена слаба сянка в емайла, която се дължи на образуваната подповърхностна емайлова лезия. От направените измервания се установи, че средната дълбочина на лезиите е **91±14 μm** (фиг. 50).

След деминерализацията стойностите на ЛКО в изкуствените кариозни лезии намаляват незначително спрямо тези на интактния емайл.



Фиг. 50. Трансверзален КМТ срез на образец със създадена изкуствена кариозна лезия.

В резултат от реминерализиращата терапия се установява постепенно повишаване на минералната емайлова плътност, като най-високи средни стойности на ЛКО се регистрират в групата на Curodont и при трите изследвани периода (фиг. 51).



Фиг. 51. Средни стойности на ЛКО на емайла през различните етапи от експеримента.

При сравнението на различните интервали на въздействие се доказва, че при 1- и 4-седмичен период има разлика в минералната плътност между отрицателната контролна група спрямо FluorProtector S и Curodont (табл. 21).

Таблица 21. Резултати от проверката за разликата в минералната плътност между реминерализиращите вещества през различните етапи на експеримента.

Група	Начално състояние	Деминерализация	1 седмица	4 седмици	8 седмици
Изкуствена слюнка	7.1 ^A ±0.58	3.8 ^A ±0.38	3.8 ^A ±0.34	4.0 ^A ±0.32	4.0 ^A ±0.31
FluorProtector S	7.1 ^A ±0.55	3.8 ^A ±0.34	4.3 ^B ±0.25	4.5 ^B ±0.17	4.7 ^B ±0.66
Curodont	7.2 ^A ±0.55	3.9 ^A ±0.32	4.4 ^B ±0.15	4.8 ^B ±0.40	5.1 ^B ±0.50
<i>P</i>	p>0.05	p>0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01

*С различни главни букви са отбелязани статистически значимите разлики, като статистическа значимост се отчете при p<0.05.

Статистическа разлика между реминерализиращите агенти не се установява. Осемседмичният престой подобрява минералната плътност на образците спрямо по-кратките периоди на експозиция като разликата е съществена между всички изследвани групи (p<0,01).

Двуфакторният дисперсионен анализ показва, че комбинираното влияние на факторите време на реминерализация и вид на използвания агент, оказва статистически значим ефект върху промяната на стойностите на ЛКО (табл. 22).

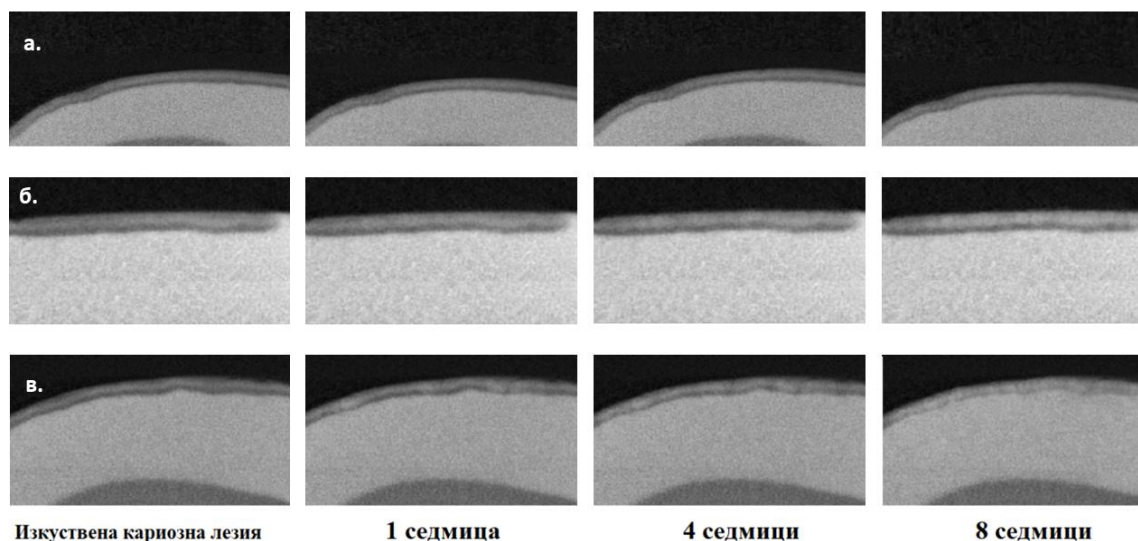
Таблица 22. Оценка на взаимното влияние на времето и вида на реминерализиращо средство върху минералната плътност на емайла, оценена чрез стойностите на ЛКО.

	<i>Type III Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
Реминерализираща терапия	14.611	2	7.306	56.014	p<0.01
Време	87.201	4	21.800	167.144	p<0.01
Взаимодействие на терапия и време	111.550	8	13.944	106.909	p<0.01

*Статистическа значимост се отчете при $p < 0.05$.

Продължителният престой на образците в разтвор на изкуствена слюнка води до постепенно повишаване на минералната плътност на емайла.

На фигура 52 са показани трансверзални томографски срезове на лезиите на един представителен образец от всяка група. В групата с изкуствена слюнка и за трите изследвани периода се установява минимална промяна в емайловата плътност (фиг. 52а).



Фиг. 52. Трансверзални КМТ срезове на образци, третирани с: **а.** изкуствена слюнка; **б.** флуорен лак; **в.** самоорганизиращ се пептид P₁₁-4.

Лезиите, третирани с флуорен лак и P₁₁₋₄, показват постепенно намаляване в интензитета на слабата сянка с напредването на престоя на образеца в разтвора на изкуствена слюнка. При флуоризирания образец се запазва слабата сянка в по-дълбоките слоеве на лезията, докато в групата на самоограничаващия се пептид се установява по-равномерно просветляване във всички участъци на емайловия дефект (фиг. 52 б, в).

Раманова спектроскопия

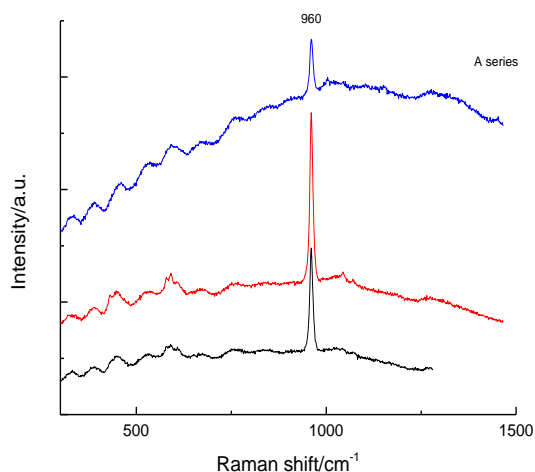
Приложеният метод на Раманова спектроскопия установи промените, които настъпват в молекулния състав на емайловата повърхност след третиране с реминерализиращите системи.

В Рамановите спектри на интактния емайл се установява пик при около 960 cm⁻¹, породен от симетричните валентни трептения на фосфатната група ν_1 (PO₄). По-слабо изразени пикове в нискочестотния диапазон 350-500 cm⁻¹ и 550 – 630 cm⁻¹ са генерирани от деформационните трептения на фосфатната група ν_2 (PO₄) и ν_4 (PO₄), а тези около 1000 cm⁻¹ от ν_3 (PO₄). В зависимост от типа заместване в структурата на хидроксилапатита, карбонатната група проявява пик, породен от симетричните валентни трептения при 1070 cm⁻¹ (B-тип карбонатната група замества фосфатната) и при 1106 cm⁻¹ (A-тип карбонатната група замества хидроксилната).

Раманови спектри на деминерализирани образци

Интензивният пик при около 960 cm⁻¹ е характерен за емайловия хидроксилапатит. В някои от спектрите се регистрират пиковете на деформационните трептения на фосфатната група ν_2 (PO₄) и ν_4 (PO₄) при

450 и 580 – 590 cm^{-1} , съответно, както и тези на В – тип - карбонатна група при 1070 cm^{-1} (фиг. 53).



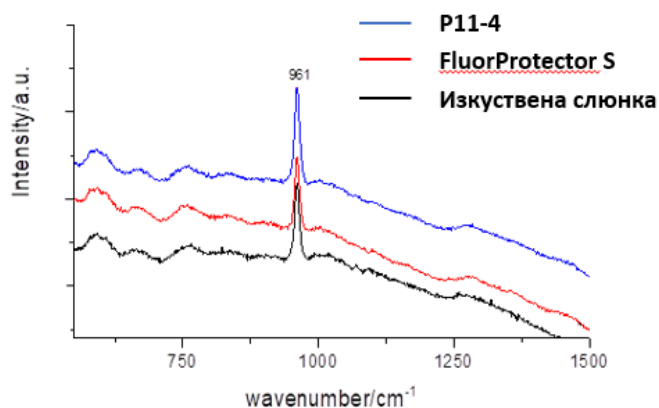
Фиг. 53. Раманови спектри на деминерализирани образци.

Установеният интензивен пик при 960 cm^{-1} е показателен за намаляване на минералното съдържимо в емайла и промяна в кристалната ориентация след деминерализацията.

Раманови спектри на реминерализирани образци, съхранявани в изкуствена слюнка за различни интервали от време, както следва:

- **Една седмица**

Регистрира се по-слабо интензивен пик при 961 cm^{-1} в сравнение с деминерализираните образци. Не се измерват другите пикове на фосфатна група на емайловия хидроксилпатит (фиг. 54).

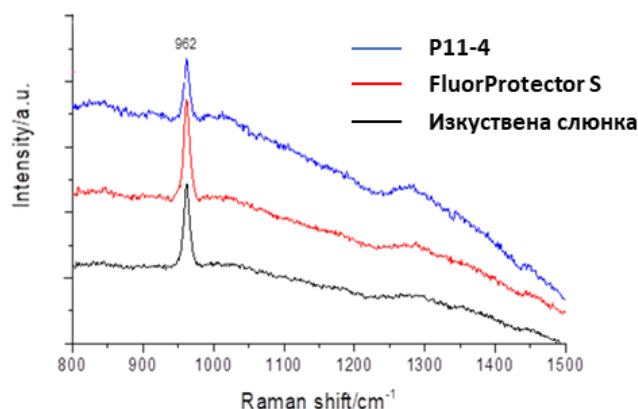


Фиг. 54. Раманови спектри на образци от всяка експериментална група, съхранявани за 1 седмица в изкуствена слюнка.

По-ниският интензитет на пика при 961 cm⁻¹ е белег за увеличаване на минералното съдържимо по емайловата повърхност.

- Четири седмици

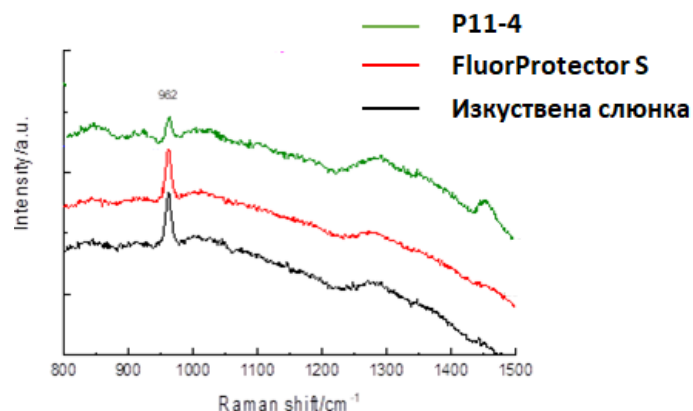
На четвъртата седмица от съхранението в изкуствена слюнка се установява по-слабо интензивен пик при 961 cm⁻¹. Не се регистрират другите пикове на фосфатна група на емайловия хидроксилпатит (фиг. 55).



Фиг. 55. Раманови спектри на образци от всяка експериментална група, съхранявани за 4 седмици в изкуствена слюнка.

По-ниският интензитет на пика при 961 cm^{-1} е белег за увеличаване на минералното съдържимо по емайловата повърхност.

- **Осем седмици**



Фиг. 56. Раманови спектри на образци от всяка експериментална група, съхранявани за 8 седмици в изкуствена слюнка.

Установява се по-слабо интензивен пик при 962 cm^{-1} . Отместването в позицията се дължи по-скоро на разширението на пиковете. В третираните с P₁₁-4 образци изглежда, че се забелязват широки пикове в областта на amidите около 1450 cm^{-1} (фиг. 56). Установяването на amidни групи може да се свърже с наличието на пептидни молекули по изследваната емайлова повърхност.

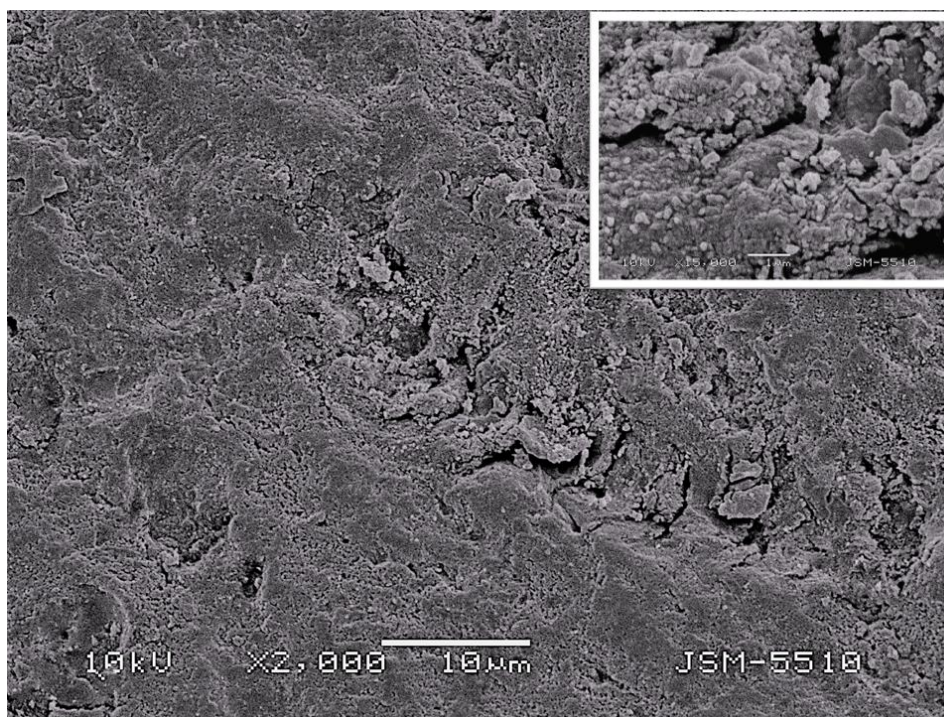
Приложеният метод на Раманова спектроскопия допълни информацията за промените, настъпващи в молекулния състав на повърхността на емайла. Установи се намаляване на интензитета на пика, породен от симетричните валентни трептения на фосфатната група $\nu_1(\text{PO}_4)$ (961 cm^{-1}) което е белег за увеличаване на минералното съдържимо при третираните с реминерализиращи вещества образци.

- **СЕМ**

Промяната в емайловата морфология на образците, третирани с P11-4 и изкуствена слюнка, флуорен лак и изкуствена слюнка и само с изкуствена слюнка се оцени чрез СЕМ за съответните периоди на експеримента – 1, 4 и 8 седмици.

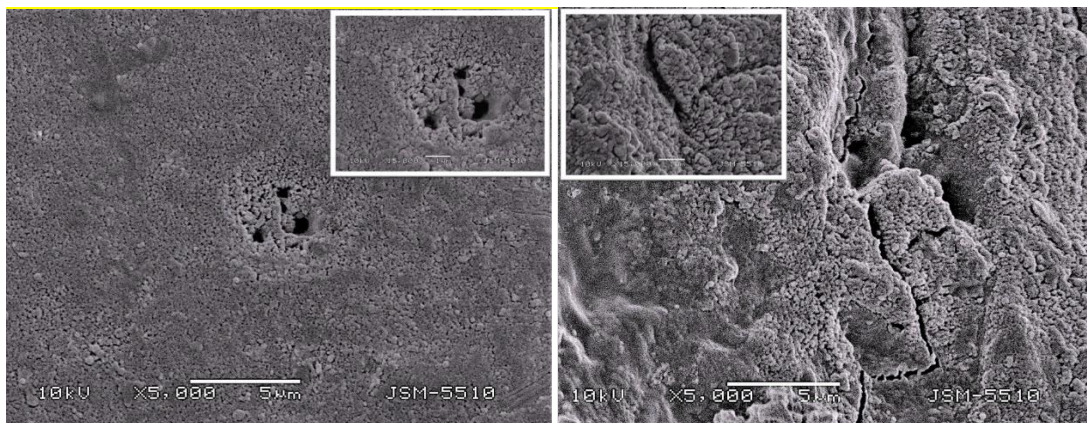
Морфологията на образците от групи 1 (изкуствена слюнка) и 2 (изкуствена слюнка и флуорен лак) наподобява наблюдаваната в групи 1 (изкуствена слюнка) и 2 (флуорен гел) от задача 2.

Образците, третирани със самоорганизиращ се пептид P₁₁-4, показваха различна повърхностна морфология през различните изследвани периоди. В края на първата седмица в отделни зони се установи наличие на неравномерно натрупване на преципитати (фиг. 57).



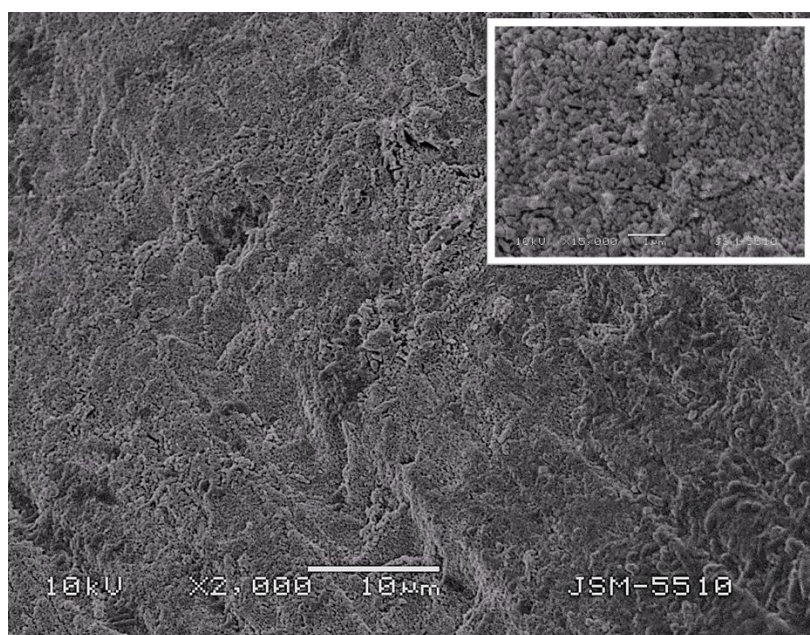
Фиг. 57 . Емайлов образец, третиран с P₁₁-4 и съхраняван в разтвор на изкуствена слюнка за 1 седмица (x2000, x15 000).

На четвъртата седмица се разкри покриване на емайловата повърхност с относително равномерен зърнист слой (фиг. 58).



Фиг. 58. Скенограма на емайлов образец, третиран с P₁₁-4 и съхраняван в разтвор на изкуствена слюнка за 4 седмици (x5000, x15 000).

Скенограмите от осмата седмица потвърдиха тенденцията за равномерно покритие на емайловата повърхност с новообразуван слой, като в отделни участъци е възможно да се наблюдават белези на ориентирана кристализация (фиг. 59).



Фиг. 59. Скенограма на емайлов образец, третиран с P₁₁-4 и съхраняван в разтвор на изкуствена слюнка за 8 седмици (x2000, x15 000).

Използваните изследователски методи (КСФ, микротвърдост по Викерс, КМТ, Раманова спектроскопия и СЕМ) доказаха, че третирането на изкуствените емайлови лезии с P11-4 води до възникването на реминерализация както на повърхността, така и в тялото на лезията. Ефектът на въздействие на реминерализиращите вещества е правопрпорционален на времето на съхранение на образците в разтвор на изкуствена слюнка.

По задача 4.

Клинично проучване за оценка на реминерализация ефект на самоорганизиращ се пептид P11-4 върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

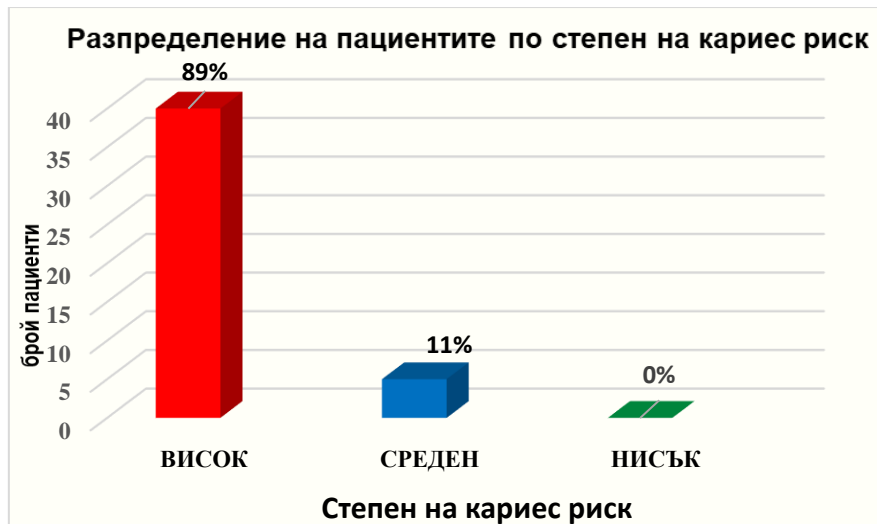
В проучването бяха одобрени да участват 45 пациенти (25 жени и 20 мъже) между 25 и 30 годишна възраст (средно 27 ± 5.6 г.) (фиг. 60).



Фиг. 60. Разпределение на участниците в проучването по пол и средна възраст на пациентите.

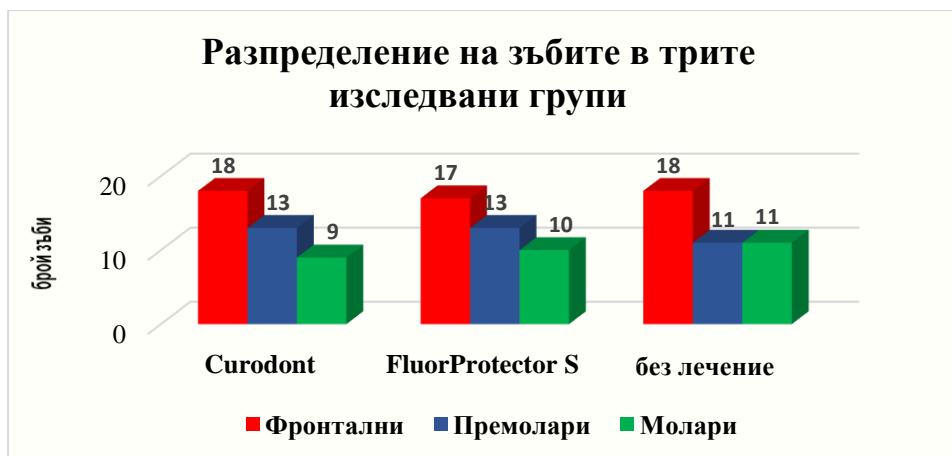
При първоначалната оценката на кариесния риск, пациентите се разпределиха, както следва (фиг. 61):

- Висок кариес риск – 40 пациенти;
- Среден кариес риск – 5 пациенти;
- Нисък кариес риск – 0 пациенти.



Фиг. 61. Процентно разпределение на пациентите според степента на кариес риск.

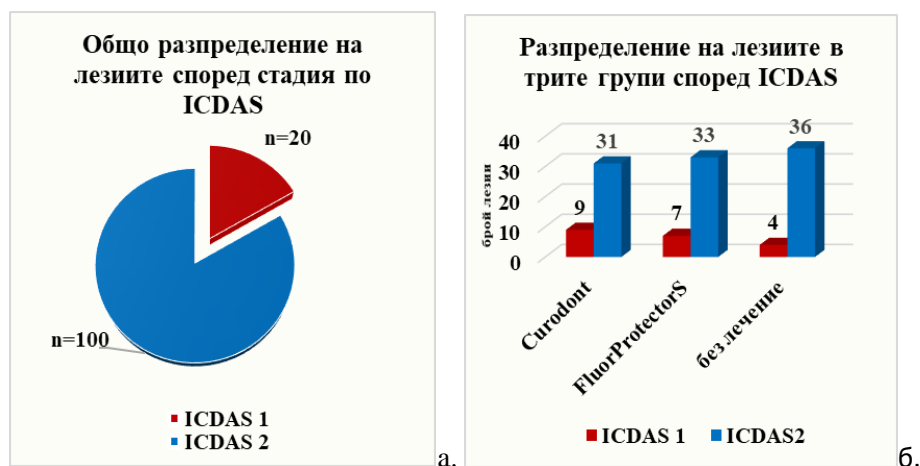
В проучването бяха изследвани 120 начални букални кариозни лезии, разпределени по равно в три групи ($n=40$). И в трите изследвани групи броят на фронталните зъби беше по-висок в сравнение с премоларите и моларите (фиг. 62).



Фиг. 62. Графика на разпределението на зъбите в трите изследвани групи.

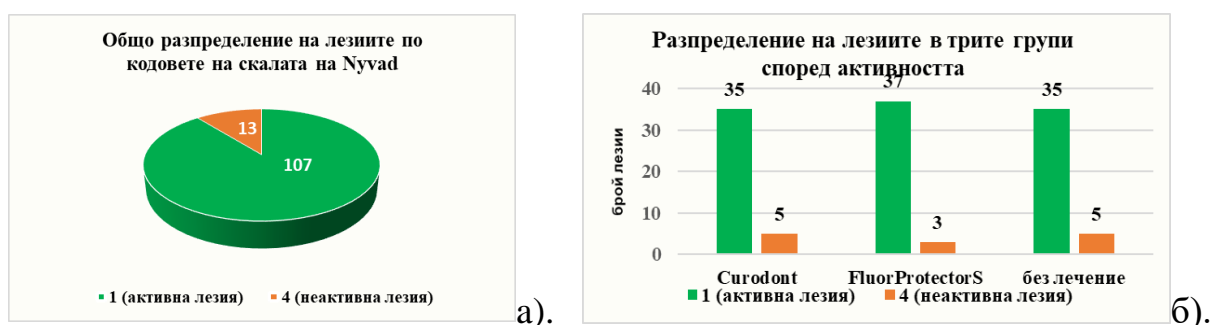
Начално разпределение на зъбите по скалите ICDAS и Nyvad

Включените в проучването лезии бяха с кодове 1 и 2 по ICDAS, което отговаря на дефиницията за начална кариозна лезия. Преобладаващата част от лезиите (83.3%) са с диагностичен код 2, докато с код 1 – 16.7% (фиг. 63).



Фиг. 63. Графично разпределение на лезиите според стадия на развитие по ICDAS: а) общо разпределение; б) разпределение по групи.







Определянето на активността на лезиите се извърши по кодове 1 и 4 от скалата на Nyvad, които описват състоянието на некавитирана лезия. Код 1 обозначава активна кариозна лезия, а код 4 – стационарна. Установени са 107 активни лезии (89.1%), докато неактивните са 13 (10.9%) (фиг. 64).



Фиг. 64. Разпределение на лезиите според активността им: а) показано е общото разпределение; б) показано е разпределението на лезиите в трите групи.

Резултати от контролните прегледи с КСФ

Направено е сравнение между стойностите на показателите ΔF , (дълбочина на лезията), ΔQ (обем на лезията) и Area (площ на лезията) в началото на клиничния експеримент и тези, регистрирани при контролния преглед след 6 месеца, както и в края на проучването – 12-ти месец и при трите експериментални групи (фиг. 65).

		Начало		6-ти месец		1 година	
Клинични изображения							
							
		Зъб 21	Зъб 22	Зъб 21	Зъб 22	Зъб 21	Зъб 22
стойност	ΔF	-10.9	-11.7	-5.4	-7.2	-5.2	-6.9
	ΔQ	-2208	-2737	-1023	-1003	-1001	-1001
	Area	466	202	230	101	228	99

Фиг. 65. Клинични и КСФ изображения и резултатите от софтуерния анализ на изследваните параметри.

Дълбочина на лезията – ΔF

Показателят ΔF , измерен чрез КСФ, показва дълбочината на лезията и се регистрира в отрицателни стойности. Повишаването на числените

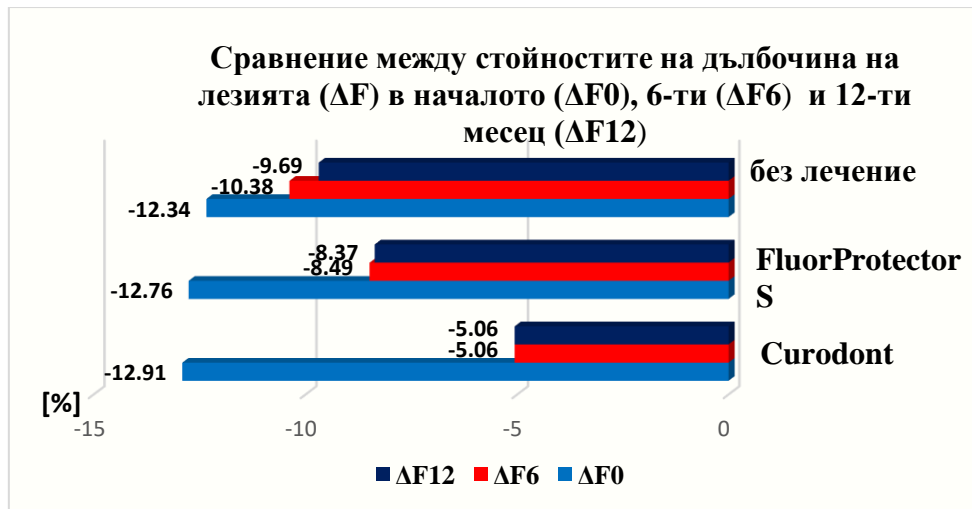
стойности на ΔF е индикация за намаляването на дълбочината на лезията. За установяването на междугруповите зависимости за средните стойности на ΔF е извършен еднофакторен дисперсионен анализ и post-hoc тест на Dunn-Bonferoni (табл. 23).

Таблица 23. Междугрупово сравнение на средните стойности на показателя дълбочина на лезията (ΔF) за трите етапа на проучването.

ΔF	Curodont		FluorProtector S		Без лечение		p
	n	Mean/SD	n	Mean/SD	n	Mean/SD	
Начало (ΔF_0)	40	-12,91± 4,40	40	-12,76±3,99	40	-12,34±4,15	NS
6 месеца (ΔF_6)	40	-5,06±1,79 ^a	40	-8,49±2,90 ^b	40	-10,38±3,22 ^c	<0.05
12 месеца (ΔF_{12})	40	-5,06 ±1.83 ^a	40	-8,37±2.83 ^b	35	-9,69±2.78 ^b	<0.001

*С различни малки букви се отбелязват статистически значимите стойности.
NS – не се установява статистическа значимост.

При сравнение между трите групи по показателя ΔF в различните периоди на лечението се доказва, че типът на терапията води до редуциране на дълбочината на лезията спрямо контролната група и при двата изследвани периода като статистическа значимост има само при стойностите, отчетени след половин година. Значително намаляване на дълбочината на лезията след 6 и 12 месеца се установи при апликацията на Curodont спрямо FluorProtector S ($p < 0.001$). Въпреки по-доброто повлияване на ΔF_{12} след приложението на FluorProtector S спрямо отрицателната контролна група, различията между тях останаха без статистическа значимост ($p = 0.078$).



Фиг. 66. Графично представяне на разликата в средните стойности на ΔF в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

В групата на Curodont се установи повече от два пъти по-голямо повишаване на средните стойности на ΔF (редуциране на дълбочината на лезията) на 6 и 12 месец спрямо изходното състояние (фиг. 66).

Извършено е вътрегрупово сравнение по показателя дълбочина на лезията за сравнение на средни стойности при свързани извадки (табл. 24).

Таблица 24. Вътрегрупово сравнение на средните стойности на ΔF при трите групи в началото и 6 и 12 месеца по-късно

ΔF		N	Средна аритметична стойност	Стандартно отклонение	$P_{0-6 \text{ м.}}$ $P_{6-12 \text{ м.}}$
CURODONT	F0 (%)	40	-12,912	$\pm 4,40$	$<0,001$ NS
	F6 (%)	40	-5,060	$\pm 1,79$	
	F12 (%)	40	-5,068	$\pm 1,83$	
FLUORPROTECTOR S	F0 (%)	40	-12,76	$\pm 4,00$	$<0,001$ 0,010
	F6 (%)	40	-8,49	$\pm 2,90$	
	F12 (%)	40	-8,37	$\pm 2,83$	
Без терапия	F0 (%)	40	-12,34	$\pm 4,15$	$<0,001$ NS
	F6 (%)	40	-10,38	$\pm 3,22$	
	F6 (%)	35	-9,71	$\pm 2,79$	
	F12 (%)	35	-9,686	$\pm 2,78$	

*Статистическа значимост се отчете при $p < 0.05$. NS – не се установява статистическа значимост.

Получените данни сочат, че в групите на Curodont и без терапия се установи статистически значимо повишаване на стойностите на ΔF (редуциране на дълбочината на лезията) на шестия месец от началото на изследването. При сравняването на резултатите между едногодишния период на проследяване спрямо тези на полугодieto, не се доказаха статистически разлики. Единствено в групата на FluorProtector S се запази тенденцията за значимо редуциране на дълбочината на лезията и на 12 месец ($p=0.010$).

Обем на лезията – ΔQ

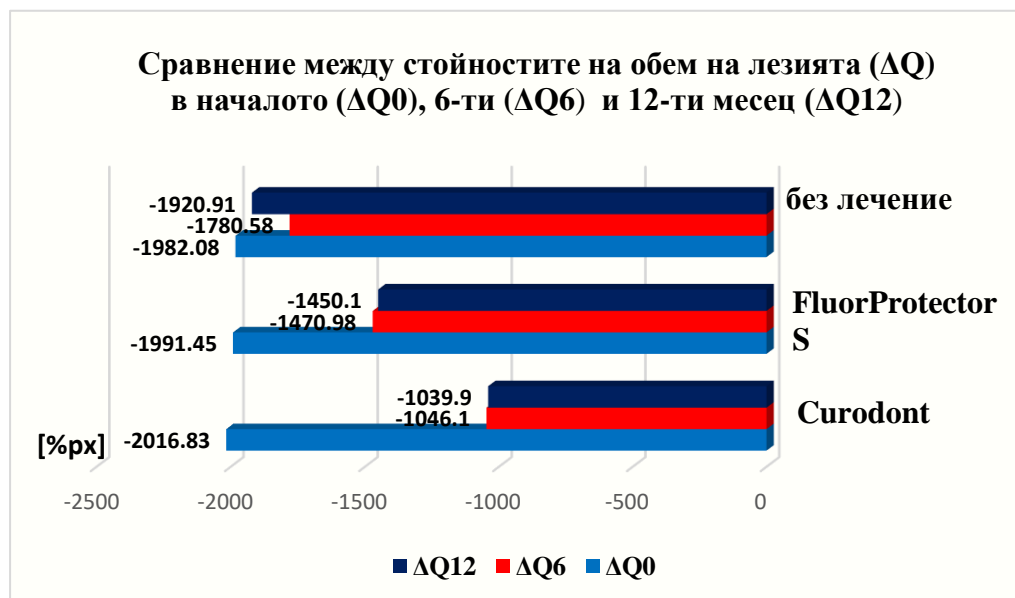
Показателят ΔQ , измерен чрез КСФ, показва обема на лезията и се регистрира в отрицателни стойности. Повишаването на числените стойности на ΔQ се свързва с намаляването на обема на лезията. За установяването на междугруповите зависимости за средните стойности на ΔQ е извършен еднофакторен дисперсионен анализ и post-hoc тест на Dunn-Bonferoni (табл. 25).

Таблица 25. Междугрупово сравнение на средните стойности на показателя обем на лезията (ΔQ) за трите етапа на проучването.

ΔQ	Curodont		FluorProtector S		Без лечение		<i>p</i>
	n	Mean/SD	n	Mean/SD	n	Mean/SD	
(ΔQ_0)	40	-2016,83 ± 1836,93	40	-1991,45 ± 1928,39	40	-1982,08 ± 1743,64	NS
(ΔQ_6)	40	-1046,10 ± 957,60	40	-1470,98 ± 1512,98	40	-1780,58 ± 1641,51	NS
(ΔQ_{12})	40	-1039,93 ± 951,48 ^a	40	-1450,10 ± 1501,59	35	-1920,91 ± 1675,76 ^b	0.028

*Статистическа значимост се отчете при $p < 0.05$. NS – не се установява статистическа значимост. С различни малки букви се отбелязват статистически значимите стойности.

Получените данни показват, че третирането с реминерализиращи средства води до редуциране на обема на лезията и разликата се доказва като значима само между групата на Curodont и тази без лечение на 12-месечния контролен преглед ($p=0.028$).



Фиг. 67. Графично представяне на разликата в средните стойности на обема на лезията (ΔQ) в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

На представените графики се вижда, че в групата на Curodont има двойно повишаване на средните стойности на ΔQ (редуциране на обема на лезията) на 6 и 12 месец спрямо изходното състояние (фиг. 67). В другите две групи също се наблюдава намаляване на обема на лезията (FluorProtector S > без лечение).

Извършено е вътрегрупово сравнение по показателя обем на лезията за сравнение на средни стойности при свързани извадки (табл. 26).

Таблица 26. Вътрегрупово сравнение на средните стойности на обема на лезията (ΔQ) при трите групи в началото и 6 и 12 месеца по-късно

КСФ параметри		N	Средна аритметична стойност	Стандартно отклонение	P 0-6 м. P 6-12 м.
Curodont	Q0 (%рх)	40	-2016,83	±1836,93	NS
	Q6 (%рх)	40	-1046,10	±957,60	
	Q12 (%рх)	40	-1039,93	±951,48	
FluorProtector S	Q0 (%рх)	40	-1991,45	±1928,39	NS
	Q6 (%рх)	40	-1470,98	±1512,99	
	Q12 (%рх)	40	-1450,10	±1501,59	
Без терапия	Q0 (%рх)	40	-1982,08	±1743,64	NS
	Q6 (%рх)	40	-1780,58	±1641,51	
	Q6 (%рх)	35	-1919,80	±1674,72	
	Q12 (%рх)	35	-1920,91	±1675,756	

*Статистическа значимост се отчете при $p < 0.05$. NS – не се установява статистическа значимост.

В трите изследвани групи се установи статистически значимо повишаване на стойностите на ΔQ (редуциране на обема на лезията) на шестия месец от началото на изследването. При сравняването на резултатите между едногодишния период на проследяване спрямо тези на полугодиято, не се доказаха статистически разлики в нито една от експерименталните групи.

Площ на лезията – Area

Показателят Area, измерен чрез КСФ, показва площта на лезията и се регистрира в положителни стойности. Намалването на числените стойности на Area е индикация за редуцирането на площта на лезията.

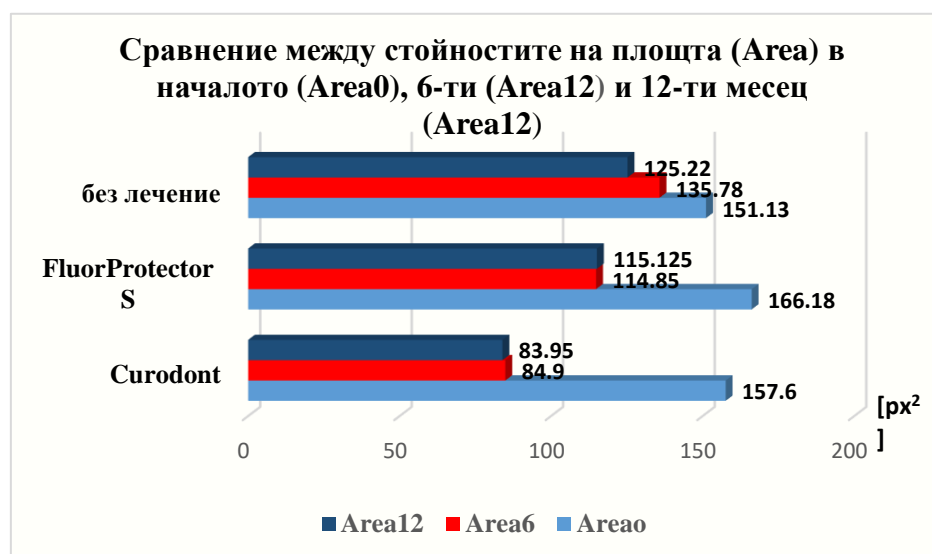
За установяването на междугруповите зависимости за средните стойности на Area е извършен дисперсионен анализ и post-hoc тест на Dunn-Bonferoni (табл. 27).

Таблица 27. Междугрупово сравнение на средните стойности на показателя площ на лезията (Area) за трите етапа на проучването.

Area	Curodont		FluorProtector S		Без лечение		p
	N	Mean/SD	N	Mean/SD	N	Mean/SD	
(Area0)	40	157,60 ±124,99	40	166,18±182,32	40	151,13 ± 101,29	NS
(Area6)	40	84,90 ± 73,25	40	114,85 ± 123,55	40	135,78 ± 93,38	NS
(Area12)	40	83,95 ± 72,6	40	115,13 ± 123,61	35	125,23 ± 92,27	NS

*NS – не се установява статистическа значимост.

При сравнение на средноаритметичните стойности между трите групи по показателя Area в различните периоди на лечението се доказва, че типът на терапията води до редуциране на площта на лезията на 6 и 12 месец от началото на лечението, но стойностите са без статистическа значимост.



Фиг. 68. Графично представяне на разликата в средните стойности на площта на лезията (Area) в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

На фигура 68 се вижда, че на 6-ти и 12-ти месец след началото на лечението в групата на Curodont стойностите на Area са приблизително два пъти по-ниски. Лезията намалява площта си и при другите изследвани групи, въпреки че не е толкова ясно изразено, както при Curodont (фиг. 68).

Извършено е вътрегрупово сравнение по показателя площ на лезията за сравнение на средни стойности при свързани извадки (табл. 28).

Таблица 28. Вътрегрупово сравнение на средните стойности на площта на лезията (Area) при трите групи в началото и 6 и 12 месеца по-късно

КСФ параметри		N	Средна аритметична стойност	Стандартно отклонение	P 0-6 м. P 6-12 м.
Curodont	A0 (px ²)	40	157,60	±125,00	NS
	A6 (px ²)	40	84,90	±73,25	
	A12 (px ²)	40	83,95	±72,60	
FluorProtector S	A0 (px ²)	40	166,18	±182,32	NS
	A6 (px ²)	40	114,85	±123,55	
	A12 (px ²)	40	115,13	±123,61	
Без терапия	A0 (px ²)	40	151,13	±101,29	NS
	A6 (px ²)	40	135,78	±93,38	
	A6 (px ²)	35	123,91	±91,02	
	A12 (px ²)	35	125,23	±92,27	

Анализът на данните показва, че в групите на Curodont и без терапия има статистически значимо намаляване на стойностите на Area (редуциране на площта на лезията) на шестия месец от началото на изследването. При сравняването на резултатите между едногодишния период на проследяване спрямо тези на полугодията, не се доказаха статистически разлики в тези две групи. От друга страна, при третирането с FluorProtector S се запази тенденцията за значимо намаляване на площта на лезията и на 12 месец (p=0.010).

На шестия и дванадесетия месец се установи повишаване на стойностите при ΔF и ΔQ , и намаляване – при Area спрямо изходните

результати във всяка група. Това е индикация за редуцирането на дълбочината, обема и площта на лезията, като междугруповото сравнение разкри следната зависимост: Curodont > Fluorprotector S > отрицателна контролна група.

Кодовете по ICDAS и Nyvad са отчетени и представени като категорийни променливи с абсолютен брой и относителен дял. За сравнението им са използвани тестовете на Willcoxon и McNemar.

Не се доказва влияние на лечението по отношение на ICDAS в началото, както и Nyvad в началото и на 6-ти и 12-ти месец ($p > 0,05$).

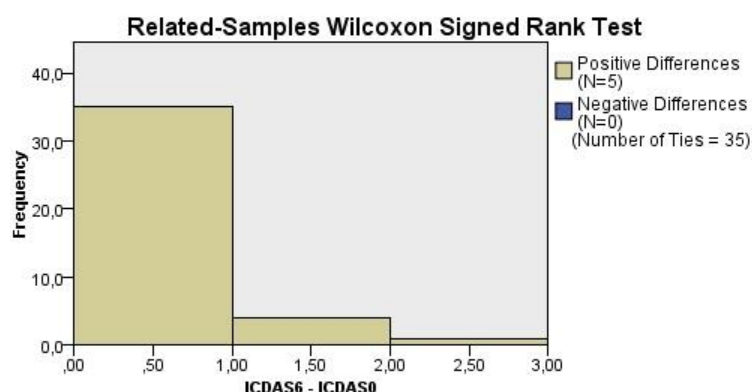
На шестия месец се регистрира и код 3 по ICDAS само в групата без лечение.

Таблица 29. Разпределение на лезиите по ICDAS в етапите на проучването.

ICDAS		Група						p
		Curodont		Fluorprotector S		без лечение		
		n	%	n	%	n	%	
Начало	1	9	22,5%	7	17,5%	4	10,0%	ns
	2	31	77,5%	33	82,5%	36	90,0%	
6 месеца	1	9	22,5%	7	17,5%	3	7,5%	$p < 0,05$
	2	31	77,5%	33	82,5%	32	80,0%	
	3	0	0,0%	0	0,0%	5	12,5%	
12 месеца	1	9	22,5%	7	17,5%	3	8,6%	ns
	2	31	77,5%	33	82,5%	32	91,4%	

*Статистически значимите разлики се отчетоха при $p < 0,05$. ns – липсва статистическа значимост

Не се доказаха значими различия в степента на развитие на лезиите по ICDAS между началото, 6-ти и 12-ти месец от изследването в групите, третирани с Curodont и Fluorprotector S ($p > 0,05$). На шестия месец в отрицателната контролна група се отчете съществена прогресия на 5 кариозни лезии, преминали от код 2 в код 3 по ICDAS ($p = 0,034$), като те не бяха включени в следващия контролен преглед (фиг. 69).



Фиг. 69. Промяна на кодовете по ICDAS между началото и шести месец в групата без лечение.

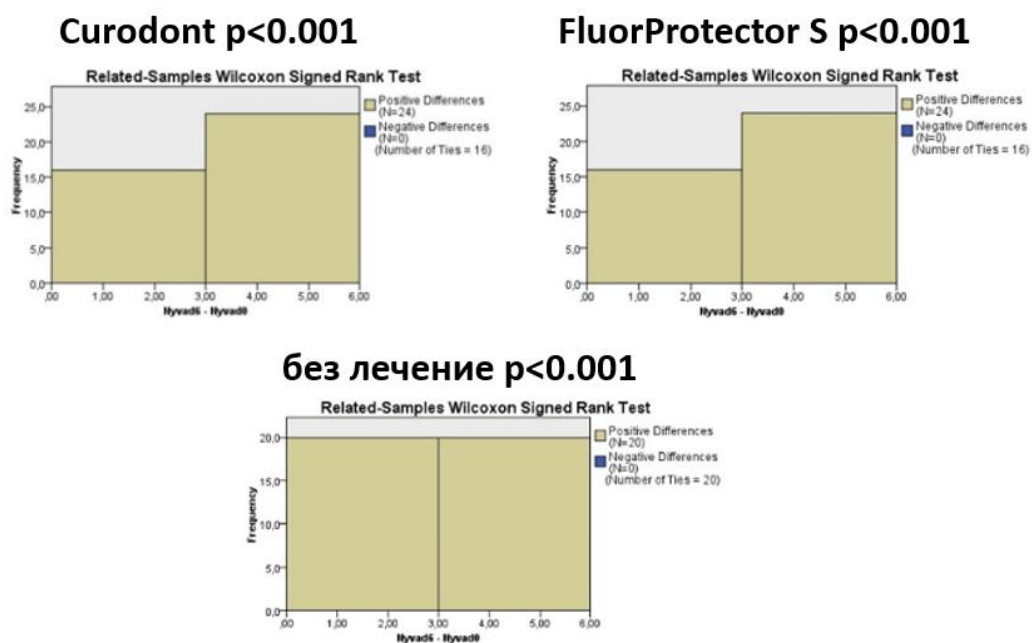
Анализът на резултатите за активност/стабилизация на кариозните лезии по критериите на Nyvad показва следните зависимости (табл. 30).

Таблица 30. Разпределение на лезиите по критериите на Nyvad в етапите на проучването.

Nyvad	Група							p
	Curodont		Fluorprotector S		без лечение			
	n	%	n	%	n	%		
Начало	активна	35	87,5%	37	92,5%	35	87,5%	ns
	неактивна	5	12,5%	3	7,5%	5	12,5%	
6 месеца	активна	11	27,5%	13	32,5%	15	37,5%	ns
	неактивна	29	72,5%	27	67,5%	25	62,5%	
12 месеца	активна	14	35,0%	13	32,5%	16	45,7%	ns
	неактивна	26	65,0%	27	67,5%	19	54,3%	

*ns – липсва статистическа значимост

Шест месеца след началото на проучването тестът на Уилкоксън установи намаляване на броя активни лезии по критериите на Nyvad и в трите изследвани групи, като промяната е статистически значима ($p < 0.001$) (фиг. 70).



Фиг. 70. Промяна на кодовете по Nuvad между началото и 6-ти месец.

Тенденцията за редуцирането на активните лезии се запази и на 12-тия месец, но не се установи статистическа разлика спрямо междинния контролен преглед и за трите изследвани групи ($p > 0.05$).

По време на проучването не установихме нежелани странични ефекти от приложението на Curodont и FluorProtector S.

VII. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

По задача 1.

Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.

Механистичните проучвания на де- и реминерализацията изучават молекулярните и физиологични механизми, по които новосинтезираните субстанции упражняват ефекта си върху зъбните структури. *In vitro* постановките, приложени в механистичните изследвания, чрез които се изследва деминерализацията, могат да се разделят на биофилмови и химически модели [403].

Киселинните буфери са разновидност на химичните модели и се използват за създаване на изкуствен кариес. Чрез тях се образува кариозна лезия, която наподобява естествения подповърхностен емайлов кариес. Необходимо е да се отбележи, че този експериментален метод не пресъздава напълно сложния процес на развитие на емайловата кариозна лезия.

За създаването на изкуствен кариес в настоящото проучване е използван лактатен буфер с $pH=4.5$. Млечната и оцетната киселини са основните агенти, които се прилагат за създаването на изкуствен кариес в редица проучвания [203, 217, 332]. Съществуват твърдения, че млечната киселина преобладава при активните кариозни лезии, докато оцетната по-често се свързва с хронично развиващите се процеси [129]. Проучване на *Chien* и кол. доказва, че млечната киселина е по-ефективна при създаването на изкуствен кариес в сравнение с други органични киселини [86]. Млечната киселина е с киселинно-дисоциационна константа (pK_a) 3.86, която е по-ниска от тази на оцетната киселина при 25 °C ($pK_a=4.76$). В това проучване авторите установяват, че ацетатният буфер създава по-дълбоки лезии, отколкото млечнокиселинният при една и съща стойност на pH . Това вероятно се дължи на факта, че нейонизираната киселинна концентрация на

оцетната киселина е по-висока от тази на млечната. Нейонизираната киселина може да дифундира и да се задържи в емайла, след което да продължи освобождаването на водородни йони с последващо разтваряне на хидроксилапатитния кристал [73].

Флуорните йони, които са добавени към буфера, предпазват повърхностния емайлов слой от разтваряне. Те взаимодействат с частично деминерализирания емайл, като образуват флуор-съдържащи калциеви фосфати, които са по-киселиннорезистентни от ХАП [40, 340]. В настоящото проучване концентрацията на флуора в буфера (0.2 ppm NaF) е по-висока в сравнение с приложената в други изследвания [29, 303]. Независимо от по-ниската концентрация на флуорни йони в тези проучвания, повърхностният слой на лезията също остава съхранен. Това би могло да се обясни и с добавянето на други вещества, като метилхидроксидифосфат (МХДФ) и карбопол, които допълнително предпазват повърхностния слой [29, 70, 73]. Установено е, че МХДФ може да се адсорбира върху емайловата повърхност [128]. Тъй като използваният от нас модел на изкуствен кариес се прилага за оценка на новосинтезирани реминерализиращи вещества, отлаганията от МХДФ и карбопол могат да повлияят резултатите от лабораторните изследвания. По тази причина не сме включили съединения, които допълнително да предпазват повърхностния слой, освен натриев флуорид.

Концентрацията на калциевите и фосфатните йони в буфера също е от значение при създаването на изкуствени кариозни лезии. При ниска концентрация на тези йони се образуват лезии със запазен повърхностен слой. Деминерализационни разтвори без добавени калциеви и фосфатни йони, създават структурни дефекти, при които целостта на повърхностния слой е нарушена [29]. *Theuns* и кол. установяват, че сатурирането на деминерализационните разтвори по отношение на тези йони, повлиява степента и времето за разтваряне на минералната фаза в емайла. Намерена

е обратнопропорционална зависимост между концентрацията им и скоростта на деминерализационния процес. В настоящото проучване количеството на калциеви и фосфатни йони е по-високо в сравнение с приложените в други проучвания [29, 368].

Silverstone и кол. установяват, че протектирането на повърхностния слой се определя предимно от химичния състав на разтворите [342]. Добавянето на гелиращи съставки, като желатин или карбоксиметилцелулоза, не оказва съществено влияние върху запазването структурната цялост на емайловата повърхност. По-високият вискозитет на геловите определя и по-продължителен процес на разтваряне на емайла, което забавя експерименталния процес [403]. Поради тази причина предпочетохме да използваме деминерализиращ буфер [342].

За създаването на подповърхностна лезия се прилагат и т.нар. рН-циклични модели, при които деминерализиращият разтвор се редува с реминерализиращ и обратно през определени времеви интервали [403]. Този подход цели доближаване на експерименталната постановка до условията за образуване на кариес в орална среда. Въпреки предимствата, които той притежава, не приложихме рН-циклиране. Използваните в този модел реминерализиращи разтвори съдържат вещества, които могат да взаимодействат с апробираните от нас новосинтезирани биомиметични системи и така да повлияят върху получените резултати.

За охарактеризиране на морфологията, механичните качества, молекулния и фазов състав на изкуствените кариозни лезии се използваха методите на инфрачервена спектроскопия, микротвърдост по Викерс и рентгено-структурен анализ и СЕМ.

Инфрачервените спектри възникват в резултат на вибрационното движение на молекулите, когато настъпи поглъщане на ИЧ светлина. ИЧ спектроскопия изследва преходите между вибрационните нива на основното електронно състояние на молекулите [239]. Зъбният емайл

образува снопчета от наноразмерни кристалисти, ориентирани с *c*-кристалографска ос, перпендикулярно на границата между емайла и дентина. Формулата на емайловия апатит $(Ca_{10-x}Na_x(PO_4)_{6-y}(CO_3)_z(OH)_{2-u}F_u)$ се различава от тази на стехиометричния ХАП $((Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ [335]. Основната минерална фаза в емайла е карбонат-хидроксилапатит, съдържащ флуорид [361]. Инфрачервените спектри в режим на отражение на недеминерализираните емайлови повърхности показваха характерните пикове за карбонат-хидроксилапатит, които се дължат на трептенията на фосфатната група (при $1050-1095\text{ cm}^{-1}$, $1400-1500\text{ cm}^{-1}$), на карбонатната група (870 cm^{-1}) и хидроксилната група (3570 cm^{-1}) в кристалната структура. Резултатите при недеминерализираните емайлови повърхности съответстват на ИЧ спектрите, получени в други проучвания [114, 313].

Разтварянето на биологичния апатит е сложен процес, повлиян от градиента на разтваряне, поръзността в структурата му и повърхностния му заряд [114]. Наличието на карбонат-хидроксилапатит, установен от спектроскопското изследване, предполага по-ниска киселиннорезистентност на емайла. По-слабото свързване на карбонатната група в кристалната решетка на ХАП води до възникването на киселинно разтворима калциево-фосфатна фаза [317]. Проведените от нас ИЧ спектри на деминерализираните образци установиха намаляване на общия интензитет на отразяване поради по-голямата поръзност на минералния повърхностен слой. По-добре изразените пикове в областта на карбонатните валентни трептения в диапазона $1380 - 1550\text{ cm}^{-1}$ и на амидите при 1650 cm^{-1} могат да се обяснят с навлизане в по-дълбоки нива на емайла. Пиковете на фосфатната група се отместват към по-малки вълнови числа, което обикновено се свързва с по-ниска степен на кристалинност [114, 239, 317].

Твърдостта на нанокристалитните структури, се определя от няколко фактора – химичен състав, степен на кристалинност, поръзност, размер и

ориентация на кристалите [68, 167, 326, 394]. В настоящото проучване изследвахме емайловата микротвърдост чрез теста на Викерс. Той се определя като недеструктивен, икономичен и достатъчно ефективен, за да оцени и сравни промените на минералната структура на емайла при деминерализация [208]. Методът се отличава с висока чувствителност при промяна на минералната плътност [47, 410]. Негов недостатък е невъзможността да се направи количествена оценка на минералната загуба, но въпреки това е информативен за процеса на деминерализация по емайловата повърхност [153]. Стойностите на VHN при недеминерализирани емайлови повърхности, получени в настоящото изследване (322.34 ± 11.23) са сравними с тези от други проучвания [203, 204, 282]. Намалването на микротвърдостта след деминерализацията (135.31 ± 2.23) може да се потвърди с установената от ИЧ спектроскопия по-ниска степен на кристалинност. Емайлт е анизотропна структура и механичните му качества не са еднакви в различните му зони. Доказано е, че емайловата микротвърдост е по-голяма, когато измерването се извършва успоредно на надлъжната ос на емайловите призми – по *c*-оста на ХАП кристали [158, 394]. В настоящото проучване микротвърдостта се измери при стандартни условия като инденторът се позиционира перпендикулярно на изследваната зона от букалната повърхност.

Установена е взаимовръзка между емайловата микротвърдост и възрастта на пациентите [412]. С напредването на възрастта нарастват размерите на карбонатапатитните кристали (КАП). По-големите размери на КАП определят по-ниски стойности на емайлова микротвърдост [114]. С цел подобряване на експерименталната възпроизводимост, в изследването използвахме екстрахирани неретенирани мъдреци на пациенти от една и съща възрастова група (25-30 години).

Рентгено-структурният анализ позволява дефиниране на кристалинността и минералните фази на емайла. Това се осъществява чрез

сравняване с референтните характеристики за даден минерал. Чрез този метод може да бъде определена текстурата на минерала, което е в пряка зависимост с пространствената организация на съставлящите го градивни елементи [106]. Основната минерална фаза, която се определи от дифрактограмите на недеминерализираните образци в настоящото изследване, е хидроксилапатит с висока степен на кристалинност. Тези резултати съответстват и на данните от други проучвания [309, 351].

Важно е да се подчертае, че използваният метод на рентгенова дифрактометрия бе трудно приложим поради малката изследвана област от зъбите (около $3 \times 3 \text{ mm}^2$), докато нормално се изследват проби с размери $40 \times 40 \text{ mm}^2$. Поради тази причина, получените дифрактограми са с висок фон и голямо разсейване на данните по вертикалната ос (голяма средноквадратична грешка на броя импулси на ъгъл 2θ), респективно голям шум. Въпреки това, установихме силна преимуществена текстура при деминерализираните образци. Това може да се обясни с наличието на микропори по повърхността на емайловата лезия, което е доказано и в проучването на *Yagi* и кол. [396].

От направените СЕМ изображения на деминерализирани образци наблюдавахме преобладаващо разширяване на призмените граници и интерпризматичните пространства с проминирането на телата на призмите. Според някои автори този начин на разтваряне на емайла е присъщ за началните стадии на деминерализация [102, 146, 159]. В ограничени зони на изследваните образци се установи и разтваряне на телата на призмите, което също може да бъде обяснено с анизотропния минерален състав на емайла. Според *Haikel* и кол. [159] и *Frank* и кол. [146] заличаването на сърцевината на призмата е знак за по-напреднал стадий на процеса на деминерализация.

В литературата не съществува универсален метод за създаването на изкуствена кариозна лезия. Химичните модели се различават по използваните деминерализиращи вещества, киселинността и времето, за

което се прилагат. Физичните и механичните характеристики на изкуствените лезии не са еднакви и сравняването на резултатите между проучванията е затруднено [269]. Поради тази причина е важно образуваните моделни емайлови лезии да бъдат изследвани и описвани за всеки експеримент [403]. Химичните модели не пресъздават комплексния метаболизъм в биофилма, но улесняват изследването, спестяват време и дават възможност експериментът да бъде стандартизиран и възпроизводим [73, 262]. Разтворът на млечна киселина (0.1M, pH=4.5), използван в настоящото изследване, създава изкуствени кариозни лезии в емайла, които са сходни по фазов, химичен състав и механични качества. Това ги прави удобен обект за прилагане и анализиране на ефекта на експерименталните реминерализиращи системи.

По задача 2.

Изследване на реминерализационния потенциал на две полимер-контролирани биомиметични реминерализационни системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.

Биомиметичното възстановяване на емайла се определя от прецизното възпроизвеждане на неговата йерархична структура. Ключова роля в този процес заемат калциевите фосфати, които трябва да са със сходни размери, форма, ориентация и химичен състав [249]. Това би могло да се постигне с добавянето на полимерни матрици към калциево-фосфатните реминерализиращи системи [81, 121, 323, 324].

В последните години се наблюдава значителен напредък в полимер-контролираната биомиметична реминерализация на калциевите фосфати [61, 111, 334], но малка част от проучванията са фокусирани върху зъбния емайл.

Целта на настоящото изследване бе да се проследи промяната в морфологията, химичния и фазов състав на емайловата повърхност след

прилагане на полимер-контролирана реминерализираща система, като се използва модел на изкуствен кариес.

ПДМАЕМА е полимер, който се състои от ковалентно свързани 2–(диметиламино)етил метакрилатни мономери. ПДМАЕМА е използван във вирусологията [154], за пречистване на водни разтвори [415] и като лекарство-доставяща система [210]. ПДМАЕМА притежава третични аминогрупи в мономерната си молекула. Като мукоадхезивен полимер, ПДМАЕМА е катионен в подкиселена среда или когато е кватернизиран с алкилиращ агент [74, 233]. Установено е, че при по-висока температура полимерната фаза се отделя от средата на разтвора поради разпадането на водородните връзки [195]. Разтворимостта на ПДМАЕМА във воден разтвор зависи от рН на средата. При неутрално рН=7, полимерната молекула има хидрофилни и хидрофобни участъци, т.нар. амфотерна структура. При по-ниски нива на рН, молекулата е с по-голям положителен заряд, докато при рН>7 преобладава незаредената ѝ форма [236]. Положителният заряд на молекулата улеснява контакта на полимера с емайловата повърхност, която е отрицателно заредена [224]. По този начин свойствата на повърхността на емайла се променят като се затруднява образуването на плаков биофилм и се стимулира емайловата реминерализация [249]. В проучване на *Mai* и кол. се установява, че увеличаването на положителния заряд на ПДМАЕМА подобрява контрола на направляваната биоминерализация [249].

Използваният от нас разтвор е с рН=5.6, което дава възможност ПДМАЕМА да бъде в катионната си форма. Получените след йонотропното гелиране микрогелове служат като депо среда. В нея *in situ* се формираха калциеви фосфати от смесен тип – брушит, дикалциев фосфат дихидрат, октакалциев фосфат, аморфен калциев фосфат и калиев хлорид като страничен продукт. Калциевите фосфати служат за инициране на рекристализационни процеси в емайловата структура. Подобен подход е

използван в проучването на *Simeonov* и кол., като депо средата е съставена от друг полимер – хитозан [343]. Добавянето на слабо омрежена полиакрилова киселина (Карбомер) към използваната от нас система цели формирането на полиелектролитен комплекс с ПДМАЕМА. Това е възможно поради електростатичното взаимодействие между четвъртичен азотен атом от ПДМАЕМА и карбоксилатен анион от Карбомер. Полиакриловата киселина принадлежи към групата на полиелектролитите с ниска молекулна маса, които стабилизират аморфните нанопрекурсори в началните етапи на биоминерализацията. Освен това, те могат да контролират трансформирането на минералните фази на микрометрично ниво и допълнително да служат като депо среда за калциевите фосфати [92, 395]. Стабилизирането на силно реактивни прекурсорни фази е важен процес, който възпрепятства предварителната им преципитация с последващо инактивиране [411].

ПСБ принадлежи към групата на полицвитерйонните полимери. Поради наличието на еднакъв брой странични вериги с противоположен заряд, молекулата му е електрически неутрална [249]. Важна характеристика на ПСБ е по-добрата поносимост на клетките към него в сравнение с други катионни и анионни полимери [54, 198]. За разлика от него, ПДМАЕМА често бива модифициран поради известна цитотоксичност и липсата на биоразградимост [226].

Ефективността на ПСБ в контрола на минерализационните процеси е слабо проучена. В изследване на *Liu* и кол. е установено, че ПСБ стимулира триизмерно нарастване на новообразувани ХАП кристали върху синтетични хидрогелни матрици [237]. Към момента не са ни известни изследвания за ефекта от приложението на ПСБ върху деминерализиран емайл.

Поликатионните полимери (ПДМАЕМА) и бетаиновите производни (ПСБ) притежават антибактериална активност [176, 234] и затрудняват

образуването и развитието на плаковия биофилм [80, 301, 331]. Комбинирането на тези свойства с възможността за контролиране на реминерализацията, определя горепосочените полимери като потенциално средство за приложение в денталната практика [249].

От направените ИЧ спектри в групата на ПДМАЕМА/Карбомер/СаР се забелязва отместване на най-интензивните пикове на несиметричните валентни трептения на фосфатната група към 1026 cm^{-1} и 1110 cm^{-1} . Нарастването на интензитета на пиковете в областта на фосфатните валентни трептения при $1117 - 1150\text{ cm}^{-1}$, както и тези на деформационните трептения на фосфатната група при $532 - 580\text{ cm}^{-1}$, е индикация за образуване на калциеви фосфати по изследваната повърхност. Позицията на пика на симетричното валентно трептене на фосфатната група в хидроксилапатит остава непроменена. Възможно е образуване на октакалциев фосфат, който е междинна фаза, прекурсор при формирането на ХАП [228]. Появата на „неапатитни” пикове при $743, 1226$ и 1714 cm^{-1} е характерна за ПДМАЕМА. Тези резултати показват, че полимерът се задържа върху емайловата повърхност и се включва в структурата на биомиметичния реминерализиращ слой, което наподобява резултатите на *Chen* и кол. [81]. Приложението на системата, съдържаща ПДМАЕМА, показва тенденция към образуването на нанометрични кристали, наблюдавани чрез СЕМ. Те частично повтарят подредбата на нанометричните апатитни кристали в емайловата призма. Такава морфология на емайла се открива и при приложението на други полимер-контролирани реминерализиращи системи [81, 121, 323]. Хомогенната структура, която покрива отделни реминерализирани участъци от емайла, може да се обясни с остатъци от органичната съставка на системата.

ИЧ спектрите на лиофилизирани проби от ПСБ/СаР показваха образуване на брушит (дикалциев фосфат дихидрат), който се счита за междинна фаза при образуването на ХАП [96]. За разлика от ПДМАЕМА, в

преобладаващата част от спектрите на третираните с ПСБ/СаР образци, не се регистрира наличието на брушит или ПСБ по емайловата повърхност. Почти всички резултати показаха наличие на карбонатхидроксилапатит, който се открива в деминерализирания емайл. Изключение правят два образца, в които се забеляза рамо при около 1060 cm^{-1} . В нискоинтензивните спектри може да се спекулира, че има брушит от поглъщането при $990, 1060, 1140\text{ cm}^{-1}$. Въпреки противоречивите данни от инфрачервената спектроскопия, на скенограмите се вижда заличаване на очертанията на емайловите призми и наличие на минерализиран слой с равномерна, зърниста текстура по емайловата повърхност. В проучването на *Mai* и кол. при СЕМ на синтетични ХАП хидрогелове, също се наблюдават сферични частици след приложението на ПСБ, но с тенденция към образуване на струпвания [249].

За да се дефинира фазовият състав на новообразувания минерален слой се приложи рентгено-структурен анализ. Използваният метод на рентгеновата дифрактометрия бе трудно приложим поради малката изследвана област от зъбите (около $3 \times 3\text{ mm}^2$). Поради тази причина рентгенограмите са с висок фон и голямо разсейване на данните по вертикалната ос. Получените резултати сочат, че основната фаза след третирането с двете полимерни системи е хидроксилапатит, което е често срещано при биомиметичния минерален синтез. Това е в подкрепа на твърдението, че зарядът на полимерната молекула има минимално влияние върху вида на новообразуваните фази [249]. Дифрактограмите на образците, реминализирани с ПСБ/СаР, имат значително по-широки пикове от тези, реминализирани с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. Това показва, че кристалитите при ПСБ/СаР са с по-малък размер от тези при ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. Вероятно това се дължи на различните рН стойности на суспензиите и различния заряд на молекулите [240]. Това са

факторите, които в най-голяма степен влияят на размера и морфологията на частиците [249].

Повече от 50 години, флуоридните препарати се заемат основно място в профилактиката на зъбния кариес [288]. Това ни даде основание да включим група, в която емайлт се третира с флуорен гел. За да се осигури възпроизводимост на резултатите, образците бяха третирани с трите реминерализиращи вещества при еднаква продължителност. Механизмът на действие на флуоридите би могъл да се обясни с класическата теория за минерализация, според която реминерализацията зависи от вида и количеството остатъчни кристали [132]. ИЧ спектрите на третираният с флуор емайл показват много нисък интензитет на отражение. Забелязват се пикове в областта на амидите (1650 cm^{-1}), което се открива и при деминерализирания емайл. Допускаме, че това може да се дължи на краткото време за действие на флуорния гел, което при други проучвания е повече от седем дни [76]. От друга страна, рентгено-структурния анализ демонстрира образуването на NaHF_2 по емайловата повърхност, а при СЕМ изследването се регистрира наличието на плътен минерален слой в централната част на призмите.

Скенограмите на образците, съхранявани в изкуствена слюнка, разкриват леко заличаване на очертанията на призмите. Няма съществени изменения в ИЧ спектрите спрямо тези на деминерализирания емайл. Резултатите са в подкрепа на твърдението, че съставът на изкуствената слюнка е недостатъчен за самостоятелно индуциране на реминерализационен процес в емайла [192, 332, 357].

Промените в минералното съдържимо на емайла водят до изменения в оптичните му характеристики, което може да се оцени чрез лазерна флуоресценция. Интензитетът на ЛФ се определя от степента на бактериалната контаминация, която е в правопрпорционална зависимост с дълбочината на лезията [139].

Лекото завишаване на стойностите на лазерната флуоресценция след деминерализация, което отчетохме, може да се обясни с нарушаването на структурната цялост на емайла, поради загуба на минерално съдържимо [261]. След въздействието с полимер-контролираните реминерализиращи системи, при някои образци се наблюдава снижаване на стойностите на ЛФ спрямо деминерализацията. *Diniz* и кол. обясняват този ефект с намаляване на порьозността на емайловата повърхност [108].

Някои среди за съхранение на зъбите, в състава на които участват тимол, формалин, физиологичен разтвор, хипохлорит, могат да окажат влияние върху оптичните свойства на емайла [194]. В проведеното от нас проучване повишаването на средните стойности на ЛФ при реминерализацията в сравнение с изходните, вероятно се дължи на оставащите частици от полимерните системи, които установихме и чрез СЕМ.

Недостатък на използваната методика с химичен модел на изкуствен кариес е липсата на бактериален плаков биофилм и продуцираните фотопорфирини, чието излъчване се улавя от DiagnoDent Pen. Подобни изводи правят и други автори [262, 263].

Използваните полимерни системи се прилагат за първи път за реминерализация. *In vitro* изследването е фокусирано върху прякото им участие в структурните промени на емайла. Установихме, че новосинтезираните вещества имат потенциал да индуцират рекристализационни процеси за относително по-кратък период от време (7 дни) в сравнение с други съществуващи полимерни системи [324]. ПДМАЕМА/Карбомер/СаР показва най-добри резултати като потенциален биомиметичен агент за реминерализация. Би могло да се допусне, че полимерите в реминерализиращите суспензии, играят ролята на органична матрица между възстановените кристали и ецвания емайл като контролират едновременно минералната нуклеация и кристалния растеж. Конкретните

механизми, които водят до реминерализация, не са установени, което налага провеждането на допълнителни проучвания.

По подзадача 2.1.

Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализационна система (ПДМАЕМА/ Карбомер/ СаР).

Установеният от нас реминерализиращ потенциал на системата ПДМАЕМА/Карбомер/СаР, даде основание за провеждането на допълнителни изследвания. Целта на настоящото проучване бе да се проследи промяната в микротвърдостта на емайла при прилагане на новосъздадената полимерна система като се използва модел на изкуствен кариес.

Тестът за микротвърдост по Викерс се определя като лесен за изпълнение, икономичен и достатъчно ефективен, за да оцени и сравни промените на минералната структура на емайла при деминерализация и реминерализация [208]. Въпреки че е изключително чувствителен при промяна на минералната плътност, методът не отчита количествената минералната загуба или новопридобитата минерална структура [153].

Анализът на литературата показва, че няма специфични параметри, при които да се изследва микротвърдостта на емайла. Товарът, който може да се използва за измерването, варира от 1 до 1000 g при различно време [88]. Изборът на по-голяма сила прецизира изследването, тъй като се получава по-голям по площ отпечатък, който може да бъде измерен по-точно [208]. За настоящото проучване определихме товар 300 g за време 15 секунди. Спазването на разстоянието между отделните точки на измерване е от съществено значение за точността на изследването. При съприкосновението на индентора с емайла, в близост до отпечатъка, се образуват микропукнатини, които повлияват механичните му качества [77]. Това е причината да определим разстояние от 120 μm между отделните

точки, подобно на *Katakam* и кол. [208]. В други изследвания авторите избират по-малки разстояния [88].

Нарушаването на повърхностната цялост на емайла по време на експеримента определи и препаративния дизайн на образците. Стойностите на VHN в началото и след деминерализацията се регистрираха върху едната половина на образеца, а другата се използва за оценка на реминерализацията. По този начин се ограничи влиянието на метода върху възпроизводимостта на резултатите.

Подготовката на образците е подобна на тази от проучванията на *Wongkhantee* и кол. и *Sukasame* и кол. Чрез полирането се осигурява плоска и равна повърхност, което е важно условие за провеждането на изследването за микротвърдост [88, 208]. Когато това е изпълнено, изображенията на отпечатъците имат правилна ромбоидна форма.

Установено е, че емайловата микротвърдост варира в зависимост от степента на минерализация на емайла, структурните различия на призмите и тупите и увеличената порьозност на емайла [282]. Регистрираните начални стойности на VHN (330.64 ± 12.32) са сравними с получените от други автори [203, 204, 282].

След седемдневно аплициране на ПДМАЕМА/Карбомер/CaP установихме статистически значимо повишаване на стойностите на VHN (231.62 ± 8.35), сравнено с измерената микротвърдост на деминерализираните образци (125.64 ± 2.41). В подкрепа на тези данни са резултатите, които получихме при СЕМ, ИЧ спектроскопия и рентгено-структурен анализ. Те доказват образуването на биомиметичен реминерализиращ слой върху емайловата повърхност.

Подобряването на физико-механичните качества на деминерализирания емайл е от съществено значение за стационарирането и/или обратното развитие на кариозната лезия [332]. Някои автори определят повишаването на микротвърдостта на емайла като достатъчно

условие за успех от реминерализиращата терапия [332]. Това твърдение е дискутабилно, тъй като в редица проучвания е установено, че флуорните препарати повишават емайловата микротвърдост [110, 148, 265, 381]. Независимо от това, ефективността на тези агенти през последните години се оказва недостатъчна при пациенти с висок кариес риск [288].

Контролът на прогресията на некавитираните емайлови лезии чрез реминерализация и управлението на оралната среда имат за цел да подобрят здравината, естетиката и функцията на съзъбието. Основен момент в тази идеология е създаването на високоефективни реминерализиращи препарати [47]. В рамките на *in vitro* проучването се доказва, че приложението на ПДМАЕМА/Карбомер/СаР води до повишаване на микротвърдостта, респективно подобряване на механичните качества на емайла. Тези резултати допълват установената способност на системата да индуцира рекристализационни процеси върху емайловата повърхност.

По задача 3.

***In vitro* изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.**

Създаването на материали, които възстановяват емайла чрез образуването на триизмерна органична матрица в тялото на емайловата кариозна лезия, е актуален проблем и предизвикателство за изследователите [332, 357]. Прилагането на самоорганизиращия се пептид P₁₁₋₄ като алтернатива в лечението на началните кариозни лезии, е стъпка напред в биомиметичния подход на реминерализация [64].

Реминерализацията, контролирана от P₁₁₋₄ в лабораторни условия, зависи в голяма степен от състава на изкуствената слюнка. В настоящото проучване използвахме рецептура с муцин, за който е известно, че е основен компонент на слюнчената придобита пеликула и повлиява дифузионните процеси върху емайловата повърхност [75]. Според някои автори

гликопротеинът повишава вискозитета на изкуствената слюнка, което може да намали дифузията на минерали [165]. Други проучвания не доказват такава зависимост [387]. *Hara* и кол. сравняват реминерализация ефект на изкуствената слюнка с и без муцин, естествена човешка слюнка и дейонизирана вода върху емайлови образци. В своето изследване те не установяват разлики между естествената и изкуствената слюнка с муцин. Авторите констатираат, че разтворът на изкуствена слюнка с муцин може да се използва като заместител на човешката слюнка в *in vitro* проучвания [165].

Киселинността на средата е друг фактор, от който зависи реминерализацият ефект на P_{11-4} . Използваната от нас изкуствена слюнка е с $pH=6.5$, тъй като мономерната, течна форма на пептида се трансформира в биоактивна гелна мрежа при $pH<7.4$ [204]. В опит да се поддържат константни стойности на pH , разтворът и в трите експериментални групи се подменя ежедневно. Независимо от това, йонната сатурация на разтвора се променя в момента на взаимодействието му с образеца, когато започват процеси на преципитация [283].

В литературата са описани други подобни експерименти, но при тях образците са поставени на дъното на контейнер с изкуствена слюнка [67, 203, 217, 332]. Недостатък на тази лабораторна постановка е възможността за гравитационно отлагане на утайки върху емайловата повърхност. Поради тази причина, в проведеното от нас проучване, образците са потопени и позиционирани в центъра на Бехерова чаша като емайловата повърхност е успоредна на надлъжната ос на съда. Тази позиция цели да се ограничи замърсяването на изследваната област с вторични рекристализационни продукти. Всекидневното трикратно разбъркване на разтвора върху електромагнитна бъркалка и достатъчният обем изкуствена слюнка (100 ml) потенцират циркулационните дифузионни потоци [295]. Активирането на

разтвората се извършва чрез поставен магнит на дъното на чашата. По този начин се ограничава влиянието на оператора върху експеримента.

КСФ се използва за оценка на де- и реминерализацията в емайла. Загубата на минерално съдържимо може да се измери чрез промяната във флуоресценцията, излъчена от зъбните структури [192].

Въпреки високата специфичност на метода, той притежава и някои недостатъци [41, 44, 298, 329], които могат да бъдат контролирани чрез структурирането на експерименталната постановка. С цел ограничаване влиянието на околната светлина, поставихме обектива на камерата в затворена, непрозрачна кутия. Образецът се позиционира по един и същ начин върху поставка, като разстоянието между него и обектива се запазва константно (5 cm) през всички етапи на проучването.

Друг фактор, оказващ влияние върху оптичните качества на емайла, е степента на неговата дехидратация [41, 298]. Поради това определихме време от 5 секунди за подсушаване с разсеяна въздушна струя на всеки образец след изваждането му от течната среда. Препарирането на образци с еднаква дебелина от 3 mm, се определи от факта, че интензитетът на излъчената флуоресценция зависи от количеството флуорофори, които се намират предимно в дентина [229].

Основните показатели за оценка на минералната структура на емайла чрез КСФ са ΔF (дълбочина на лезията) и ΔQ (обем на лезията). Понижаването на числените им стойности означава по-голяма загуба на флуоресценция, респективно загуба на минерално съдържимо. Групата, в която се приложи пептид P₁₁-4, показва по-голямо повишаване на ΔF и ΔQ , спрямо деминерализацията, в сравнение с флуорния лак и контролната група за трите изследвани периода. Тези резултати бяха потвърдени и от компютърното микротомографско изследване. Методът е недеструктивен и се отличава с високата си разделителна способност при сканирането на емайлови образци [413]. Точността на КМТ при оценката на

минерализирани структури е съизмерима с тази на трансверзионната микрорадиография – метод, определен като златен стандарт в *in vitro* изследването на минерална плътност [161]. Приложихме КМТ, за да проследим триизмерната промяна на минералната плътност в обема на изкуствената лезия. Най-високи стойности на линейния коефициент на отслабване се установиха в групата на P₁₁₋₄, като повишаването им се регистрира още в края на първата седмица, подобно на изследването на *Üstün* и *Aktören* [375].

Получените резултати биха могли да се обяснят с механизма на действие на пептида. Мономерната форма, която използвахме за проучването, се отличава с нисък вискозитет, което подпомага дифундирането на P₁₁₋₄ в по-дълбоките слоеве на лезията. Там се образува мрежа, която се свързва химически с емайловата структура като се създават условия за зародишообразуване и нарастване на ХАП кристали [67, 217, 332, 357]. Някои изследователи използват определението „направлявана емайлова регенерация“ (NER) за обозначаване на промените, които настъпват в емайла след апликацията на P₁₁₋₄, по аналогия с направляваната тъканна и костна регенерация [37]. Те разглеждат тялото на кариозната лезия като свободно пространство, в което се натрупват калциеви и фосфатни йони, преминали през полупропускливата повърхностна зона. В литературата точността на термина NER се подлага на дискусия [332]. Зародишообразуването и растежът на ХАП кристали не може да се счита като достатъчно условие за настъпването на регенерация или *restitutio ad integrum* на емайловата лезия. Към момента няма доказателства, че новообразуваните кристали са подредени в емайлови призми [36]. От друга страна, се поставя въпросът дали пълната регенерация на емайла е практически необходима. Според някои автори повишаването на емайловата микротвърдост е достатъчен резултат от приложението на реминерализиращи средства. Допуска се, че подобряването на механичната

стабилност на лезията ограничава прогресията ѝ и възникването на кавитация [332].

Промяната в механичните качества на емайла е показател, който се анализира при изпитването на реминерализиращи средства [203, 204, 311]. Изследването на повърхностна микротвърдост по Викерс измерва устойчивостта на даден материал към пластична деформация като се прилага стандартен източник на сила за определен период от време. В проведеното от нас проучване и двете реминерализиращи системи показаха способност да повишават емайловата микротвърдост в сравнение с отрицателната контролната група. Най-високи средноаритметични стойности на VHN се регистрираха при образците, третирани с P₁₁₋₄.

Приложените изследователски методи доказаха, че повишаването степента на минерализация на емайла и при трите групи е правопрпорционално на времето, за което образците се съхраняват в изкуствената слюнка. Тези резултати могат да се обяснят с нарастването на новообразуваните кристали, което е продължителен процес [203, 204]. Поради тази причина в края на осмата седмица на SEM наблюдавахме и белези на ориентирана кристализация. *Jablonski-Momeni* и кол. също установяват редуциране на загубата на флуоресценция на 8-ма и 12-та седмица след апликацията на P₁₁₋₄. В допълнение, авторите докладват, че в края на проучването е настъпила почти пълна реминерализация на изследваните от тях образци [192].

Рамановата спектроскопия се използва за установяване на молекулния състав на минерализирани структури [320, 328]. Осново значение за това има трептението на фосфатната група, съдържаща се в емайловия хидроксилапатит. Амплитудата в пиковете на фосфатната група в Рамановите спектри е в правопрпорционална зависимост от минералния състав на емайла [33]. При деминерализираните образци се регистрира интензивен пик при около 960 cm⁻¹, което е в съответствие с данните,

получени в други проучвания [69]. Установено е, че тези промени се дължат на намаляване на минералното съдържимо в емайла и промяна в кристалната ориентация вследствие на деминерализацията [69, 187]. Намаляването на интензитета на пиковете при $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ и при трите изследвани групи вероятно се дължи на настъпилата реминерализация, като най-слаб е интензитетът на осмата седмица от началото на експеримента. Важно е да се отбележи, че изследването на биологични образци чрез Раманови спектри често е възпрепятствано от високото ниво на фотолуминисценция, което значително влошава отношението сигнал-шум [307]. В последните години се работи усилено за отстраняването на този недостатък на метода, което би подпомогнало включването му в ранната диагностика на кариеса и в клинични условия [69].

Най-ниски стойности на VHN, ΔF , ΔQ , ЛКО за трите изследвани периода се наблюдават в отрицателната контролна група, в която образците не са третирани с реминерализиращ агент. Концентрационният градиент на йоните в изкуствената слюнка е недостатъчен, за да се създадат условия за самостоятелна реминерализация в тялото на лезията [118, 332]. В използваната от нас изкуствена слюнка не е включена флуорна сол, което също обяснява наблюдаваната ниска степен на реминерализация [118].

Проведените от нас изследвания доказаха P₁₁-4 като възможно средство за профилактика и неоперативно лечение на начални кариозни лезии по гладки повърхности.

По задача 4.

Клинично проучване за оценка реминерализиращия ефект на самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄ върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

Пациентите, при които се провежда ортодонтско лечение, имат висок риск от развитие на кариес. Некавитираните кариозни емайлови лезии по вестибуларни гладки повърхности са най-често срещаният нежелан страничен ефект по време на и след ортодонтска терапия, с честота между 2% и 97% [171, 315, 352, 362]. Повлияването им от познатите реминерализиращи агенти показва незадоволителни резултати [103, 275, 286, 308, 373]. Това налага използването на алтернатива в неоперативното им лечение. Поради тази причина изследвахме реминерализиращата способност на P₁₁₋₄ при лезии, получени в резултат на ортодонтско лечение.

Флуорните препарати показват висока ефективност като средство за профилактика на кариеса [59, 252, 337]. Те се добавят също към калциево-фосфатните реминерализиращи системи, за да подобрят тяхното действие. От друга страна флуоридите са и част от комплексното неоперативно превантивно лечение. Тяхната ефективност намалява при третирането на вече съществуващи начални кариозни лезии [37, 66, 330]. Според някои автори успеваемостта при лечението на некавитирани емайлови лезии, при което е използван флуорен лак, възлиза на 30% [66]. Въпреки това научни проучвания доказват, че флуорните лакове имат 50 – 70% по-голяма ефективност при редуцирането на кариеса, в сравнение с други флуорни топикални агенти [278, 336]. Основно предимство на лаковете е, че те задържат флуорните йони в близост до емайловата повърхност, върху която са аплицирани [57]. В редица проучвания е установено, че флуорните препарати осъществяват ефекта си в повърхностните 30 – 50 μm от лезията, докато навлизането им в по-дълбоките слоеве е минимално [280, 332]. По този начин може да се повлияе положително върху стационарирането на

кариеса и така да се инхибира прогресията му, но не се въздейства върху тялото на кариозната лезия [66, 330]. Това обуславя нуждата от клинично апробиране на нови реминерализиращи средства, които да допълнят действието на флуора и да преодолеят недостатъците му.

P₁₁₋₄ има способността да навлезе в тялото на кариозната лезия, където мономерната форма претърпява едномерна самоорганизация и образува триизмерна мрежа, върху която възниква *de novo* зародишообразуване на ХАП кристали [216, 217]. Биомиметичните реминерализиращи системи, базирани на други пептиди (например амелогенин), също демонстрират способност да навлизат в подповърхностните емайлови лезии [323, 324]. За разлика от тях, P₁₁₋₄ не само дифундира в лезията, но с помощта на калциевите и фосфатните йони от слюнката, индуцира рекристализационни процеси в тялото ѝ. В литературата са описани и редица други самоорганизиращи се молекули, които подпомагат емайловата реминерализация като полиамидо-амин дендримери, желатин, агарозен гел, но те все още не са клинично изпитани [164].

P₁₁₋₄ е първият пептиден биомиметичен реминерализиращ агент, който се прилага клинично. Това затруднява сравняването му с други подобни вещества при оценка на клиничните резултати. Самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄ е включен в състава на групата препарати Curodont (*Credentis, Switzerland*). В проучването използвахме мономерната му форма – Curodont Repair. Съществува и друг, комбиниран препарат – Curodont Protect (P₁₁₋₄, калциеви фосфати и натриев флуорид), който е със сходни индикации за приложение, но е разработен за домашна употреба. Избрахме професионалната апликация, за да се елиминира риска от неправилно нанасяне на гела от страна на пациента.

В настоящото проучване регистрирането на промените в емайловата минерална структура се извърши чрез количествена светлинна

флуоресценция. Методът се характеризира с висока възпроизводимост и чувствителност (64-94%) [140] и се определя като един от най-достоверните за оценка и проследяване на начален кариес по гладки повърхности *in vivo* [299]. Въпреки високата му чувствителност, съществуват някои недостатъци в процедурата по регистриране на флуоресцентната загуба. Времето за подсушаване [298], остатъчната слюнка, ангулацията на камерата [44, 45], оцветяванията на емайла [329], могат да повлияят на резултатите. За да се редуцира въздействието на тези фактори, изследването се извърши от един лекар по дентална медицина при стандартни условия за позиция на пациента и ангулация на камерата. Непосредствено преди заснемането, кабинетът бе затъмнен, а зъбните повърхности – подсушени за 5 секунди, подобно на проучването на *Yin* и кол. [402].

КСФ се използва в проучвания, които оценяват и сравняват ефекта от приложението на различни превантивни средства за емайлова реминерализация [206]. Параметрите, които оценихме, са ΔF (дълбочина на лезията), ΔQ (обем на лезията) и площ на лезията. Повишаването на средните стойности на ΔF и ΔQ и редуцирането площта на лезията в групата без лечение потвърждава твърдението, че некавитираните кариозни емайлови лезии след ортодонтско лечение могат да претърпят спонтанно обратно развитие или да се стационарират поради естествената реминерализация от слюнката [212]. Изключение правят няколко лезии, които в началото имат $\Delta F > 15\%$. При тях се забеляза увеличаване на загубата на флуоресценция, подобно на изследването на *van der Veen* и кол. [378].

Третирането с флуорен лак доведе до статистически значимо намаляване на флуоресцентната загуба спрямо първоначалните измервания. Някои автори твърдят, че кариозни лезии в стадий 2 по ICDAS не се повлияват от флуорни апликации и изискват лечение с по-инвазивни техники като микроабразия [157], инфилтрация [22, 28, 105] и изобелване [212]. Въпреки това наблюдавахме подобрение и при лезиите от този

диагностичен клас. Средните стойности на ΔF , ΔQ са по-високи от тези, отчетени в групата без лечение за 6 и 12-месечен период. Това потвърждава реминерализиращата способност на флуорните лакове [222].

Най-високи стойности за ΔF и ΔQ получихме при P_{11-4} . Прави впечатление, че в тази група се отчита най-голямо повишаване на стойностите за ΔQ спрямо изходните измервания. Това би могло да се обясни със способността на пептида да реминерализира тялото на кариозната лезия [217]. По-високата степен на реминерализация, сравнена с групата с флуорен лак, може да се обясни и с влиянието на флуора от зъбните пасты (1400 ppm NaF). Установено е, че P_{11-4} и флуорните съединения имат различен механизъм и място на действие, но комбинирането им води до повишаване степента на реминерализация [37, 203, 204]. В публикуваната литература не открихме описано клинично изследване, в което се използва КСФ за оценка на реминерализацията с P_{11-4} .

Независимо от предимствата си, КСФ не може да се използва като самостоятелен диагностичен метод [140]. Той се отличава с висока чувствителност, но с по-ниска специфичност. За да се компенсира този недостатък, в настоящото проучване, КСФ се комбинира със системата ICDAS, която има висока специфичност [140]. През целия период на изследването не установихме преминаване на лезиите, третирани с P_{11-4} , в по-нисък диагностичен код по ICDAS, въпреки че средните стойности на ΔF и ΔQ са по-високи спрямо изходните. Дефинирането на ICDAS кодовете зависи от промените в оптичните качества на емайла. Те се определят от призмната организация на ХАП кристали. В проведените *in vitro* проучвания за P_{11-4} не се доказва подреждането на новообразуваните кристали в призми [140, 332]. Следователно не може да се очаква пълното визуално заличаване на белия цвят на лезиите и възвръщане на нормалната емайлова транспарентност, т.е. преминаването им от кодове 2 и 1 по ICDAS

към код 0 [66, 389]. Намаляването на флуоресцентната загуба се свързва с повишаване на минералното съдържимо в емайловата лезия. Това потвърждава способността на P₁₁-4 да индуцира реминерализационни процеси в емайла при клинични условия [37, 66, 67, 193, 330, 389]. Прогресиране на лезии в по-горен ICDAS код (код 3) с видими микрокавитации, се установи след шестмесечния контролен преглед при малък брой лезии (5 броя) в групата без лечение, чиито изходни стойности на ΔF са по-големи от 15%.

Концепцията за активен или стационаран кариес е продиктувана от разбирането за динамиката на кариозния процес и заема основно място в съвременната кариесология [21, 156]. Определянето на активността на кариозната лезия влияе върху прогнозата ѝ [189]. Една година след началото на проучването се установи намаляване на броя активни лезии по критериите на Nyvad и в трите изследвани групи. Тези резултати могат да се обяснят с увеличаването на минералната фаза на повърхността на лезията, вследствие на което текстурата ѝ се променя от матова и грапава в бляскава и гладка. Според някои автори, поради по-голямото количество пори при активната лезия, вероятността да се осъществи реминерализация в по-дълбоките ѝ слоеве е по-голяма, отколкото при стационараната лезия [330, 389]. Установено е, че третирането на неактивните лезии не е индицирано, поради силно минерализираната повърхностна зона, която блокира дифузията на йони към тялото на лезията [37]. Въпреки това в проучването бяха включени и определен брой неактивни лезии (13 от 120 лезии). Специфичното развитие на кариозния процес определя възможността стационараните кариозни лезии да преминат в активен стадий и обратно. Стойностите на флуоресцентната загуба (ΔF, ΔQ) на тези лезии показаха повишаване, което се свързва с увеличаване на минералната фаза. Тези резултати подкрепят първото клинично изпитване на P₁₁-4 от 2013 г., в което са включени само неактивни букални лезии. В края на

изследвания от авторите период, морфометричният анализ доказва клиничното подобрене на лезиите [67]. Въпреки че на шестия месец от началото на изследването лезиите продължаваха да бъдат стационарни, в края на първата година установихме преминаването на три от тях в активна форма.

Ефектът от приложението на самоорганизиращия се пептид P₁₁₋₄ зависи от реминерализационния потенциал на слюнката. Стимулираният слюнчен дебит на изследваните пациенти е в рамките на нормата. От всички проведени до момента клинични проучвания за P₁₁₋₄, само в едно [193] е изследван стимулиран слюнчен ток. Ксеростомията се счита за ограничение при прилагането на P₁₁₋₄, въпреки че до момента не е изследвана връзката между слюнчените параметри (количество, минерално съдържание, рН) и степен на реминерализация на емайла. Необходими са допълнителни проучвания в тази насока, тъй като това ограничение лишава от алтернативна реминерализираща терапия пациентите с ксеростомия, които са с висок кариес риск.

Провеждането на по-продължително клинично проучване (12 месеца) се определи от препоръките за изследване на дълготрайния ефект от приложението на пептида [37, 330]. Избирането на шестмесечния период за междинен контрол на резултатите се определи от извода в проучването на *Brunton* и кол. Авторите докладват, че растежът на ХАП кристали върху пептидната матрица, достига своя максимум между третия и шестия месец след третирането с P₁₁₋₄ [67]. Сходството в получените от нас резултати между 6-ти и 12-ти месец дава основание да подкрепим това твърдение.

По време на проучването не регистрирахме странични ефекти от приложението на P₁₁₋₄, което е в съответствие с резултатите от другите клинични изследвания [37, 66, 67, 193, 330, 389]. Също така наблюдавахме засилен интерес от страна на пациентите към новия подход за лечение на кариозни лезии, което значително повиши готовността им да сътрудничат.

Доказателство за това е явяването на всички пациенти на определените контролни прегледи.

Въз основа на получените резултати може да се твърди, че при пациентите с висок кариес риск стандартните орално-хигиенни процедури имат малък ефект върху повлияването на началните кариозни лезии. При тях е препоръчително да се включат професионални реминерализиращи процедури. За едногодишен период се доказва способността на P₁₁₋₄ да стимулира биомиметичната реминерализация *in vivo*. Групата, в която третирахме некавитираните емайлови лезии с P₁₁₋₄, показва статистически по-добри резултати по отношение дълбочината на лезията в сравнение с останалите групи. Клиничното приложение на P₁₁₋₄ е напредък в опита за постигането на емайлова регенерация и заместването на оперативния лечебен подход с неоперативен. Неоперативното превантивно лечение е съвременният подход в третирането на обратими кариозни лезии. В него основно място заема управлението на кариозния процес – на ниво зъбна повърхност, орална среда и индивид. Друг важен елемент е реминерализиращото лечение на всяка обратима и активна лезия [19]. Това спомага за съхраняването на естествените зъбни структури и тяхната функция, като се избягва или отлага възможно най-дълго конвенционалното obtуриране с пластични материали.

VIII. ИЗВОДИ

1. Разтворът на млечна киселина (0.1M, pH=4.5), приложен за 6 дни върху емайлови образци създава изкуствени кариозни лезии, които са сходни по фазов, химичен състав и механични качества.
2. Полимер-контролираните системи имат потенциал да индуцират рекристализационни процеси в емайла *in vitro*. ПДМАЕМА/Карбомер/CaP показва по-добри резултати като потенциален биомиметичен агент за реминерализация в сравнение с ПСБ/CaP.
3. Третирането на изкуствените емайлови кариозни лезии с ПДМАЕМА/Карбомер/CaP за седем дни води до значително повишаване на повърхностната микротвърдост на емайла.
4. В *in vitro* условия самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄ има реминерализиращ ефект върху изкуствените емайлови кариозни лезии, но не води до пълна емайлова регенерация.
5. Установеният реминерализиращ ефект на повърхността и в тялото на изкуствената кариозна лезия, третирани с P₁₁₋₄ *in vitro*, е в пряка зависимост от времето, за което образците се съхраняват в изкуствена слюнка.
6. Еднократното нанасяне на самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄ в клинични условия съществено редуцира дълбочината на началната емайлова кариозна лезия (ΔF), регистрирана чрез КСФ за период от 12 месеца.

IX. КНИГОПИС

1. Анастасова Р. Ранна кариесна диагностика и поправка на obturации при минимално инвазивно лечение на зъбния кариес. Дисертационен труд, МУ, ФДМ-Варна, 2018, 151 стр.
2. Бончев А, Василева Р. Съвременни средства за реминерализация на зъбния емайл. Дентална Медицина 2018; 100 (1): 42-48.
3. Василева Р, К. Пейчева. Съвременни методи за диагностика на зъбния кариес. Дентална медицина 2012, 94(3):222-27.
4. Владимирев Ст. Съвременна диагностика в консервативното зъболечение. Хабилитационен труд, Пловдив 2007
5. Гатева Н, Р. Кабакчиева. Неоперативно лечение на кариозни лезии по вестибуларни зъбни повърхности. Дентална медицина 2013, 95(2):169-75.
6. Димитрова И. Емайлова реминерализация – лабораторни и клинични изследвания. Дисертационен труд, МУ, ФДМ-София, 1994, 205 стр.
7. Дойчинова М. Профилактика на зъбния кариес с фотосенсибилизатори (експериментални, лабораторни и клинични изследвания). Дисертационен труд, МУ, ФДМ-Варна, 2015 г.
8. Дюлгерова Е, Киркова Е. Влияние на някои йонни добавки върху разтварянето на хидроксилапатит в млечна киселина. Год.СУ, ХФ. 1982; 76:204-210.
9. Дюлгерова Е, Киркова Е. Към кинетиката на разтварянето на хидроксилапатит и зъбен емайл в млечна киселина. Год. СУ, ХФ. 1982; 76:211-217.
10. Дюлгерова Е. Влияние на NaF върху линейната скорост на разтварянето на зъбен емайл в млечна киселина. Стом. 1986; 68:24-29.
11. Дюлгерова Е. Изследване върху линейната скорост на разтваряне на зъбен емайл в млечна киселина. Стом. 1986; 68:18-24.
12. Дюлгерова Е. Калциевофосфатни апатити и минерализирани орални структури (демнерализация, реминерализация и реконструкция). Докторска дисертация, София, МУ, ФДМ, 1993 г.
13. Дюлгерова Е. Кариесостатични механизми на флуора. Физикохимични аспекти. Стом. преглед. 1978; 9(2):3-9.
14. Инджов Б. Основи на кавитетната препарация, София, Инджидент, 2006.
15. Караяшева Д. Роля на слюнката в етиопатогенезата на зъбния кариес. Дисертационен труд, МУ, ФДМ-София, 2015.

16. Карова Е. Слюнката – фактор за поддържане на оралната хомеостаза. Централна медицинска библиотека, София, 2013, 94 стр.
17. Кирилова Ж. Зъбен кариес-биологични лечебни аспекти. София: Дайрект Сървисиз, 2019, 151 стр.
18. Куклева М. „Рискови фактори за зъбна флуороза“. Докторска дисертация, Пловдив, 2009.
19. Пенева М, Кабакчиева Р, Рашкова М, Цолова Е, Гатева Н, Дойчинова Л, Жегова Г. Клиника на детската дентална медицина. Бедемот. София 2018.
20. Пенева М, Кабакчиева Р, Цолова Е, Рашкова М. Профилактика на оралните заболявания. Изток Запад. София 2007.
21. Пенева М. Зъбният кариес през XXI век. София, Изток запад. 2008, 243 стр.
22. Тодорова В., Филипов И. Методи за лечение на начален апроксимален кариес използвани от българските лекари по дентална медицина. Научни трудове на СУБ, Пловдив, том 25, 2020, 407-411.
23. Тодорова В., Филипов И. Методи за ранна диагностика на начален кариес. I част. Дентална медицина 2012, 94(3):213-221.
24. Тодорова В., Филипов И. Методи за ранна диагностика на начален кариес. II част. Дентална медицина 2013, 95(1):68-80.
25. Топалова-Пиринска С, Дойчинова Л, Киров Д, Кирилова Ж. Методи за оценка на индивидуалния риск за развитие на кариес. 2018; 100(1):64-69.
26. Топалова-Пиринска С, Дойчинова Л, Киров Д, Кирилова Ж. Рискови фактори за развитие на зъбен кариес при възрастни. Дентална медицина. 2018; 100(1):56-63.
27. Топалова-Пиринска С, Карова Е. Клинично поведение при лечение на зъбния кариес и неговите усложнения. Скала Принт. София. 2013, 271 стр.
28. Филипов И., Тодорова В. Минимално инвазивна дентална медицина. Неоперативни и минимално инвазивни методи за лечение на зъбния кариес. Електронно списание на БЗС, 2014.
29. Abufarwa M, Noureldin A, Campbell PM, Buschang PH. Comparative study of two chemical protocols for creating white spot lesions: An in vitro FluoreCam evaluation. J Investig Clin Dent. 2018;9(1):10.1111.
30. Aggeli A, Fytas G, Vlassopoulos D, McLeish TC, Mawer PJ, Boden N. Structure and dynamics of self-assembling beta-sheet peptide tapes by dynamic light scattering. Biomacromolecules. 2001;2(2):378–88.
31. Aggeli A, Nyrkova IA, Bell M, Harding R, Carrick L, McLeish TC, Semenov AN, Boden N. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like

- molecules as a model for peptide beta-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):11857–62.
32. Agustsdottir H, Gudmundsdottir H, Eggertsson H, et al. Caries prevalence of permanent teeth: a national survey of children in Iceland using ICDAS. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2010;38(4):299-309.
 33. Akkus A, Akkus A, Roperto R, et al. Evaluation of mineral content in healthy permanent human enamel by Raman spectroscopy. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(5):e546-e549.
 34. al-Khateeb S, Oliveby A, de Josselin de Jong E, Angmar-Månsson B. Laser fluorescence quantification of remineralisation in situ of incipient enamel lesions: influence of fluoride supplements. *Caries Res*. 1997;31(2):132-140.
 35. al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Månsson B, et al. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res*. 1997;11(4):502-506.
 36. Alkilzy M, Santamaria RM, Schmoeckel J, Splieth CH. Treatment of Carious Lesions Using Self-Assembling Peptides. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):42-47.
 37. Alkilzy M, Tarabaih A, Santamaria RM, Splieth CH. Self-assembling Peptide P11-4 and Fluoride for Regenerating Enamel. *J Dent Res*. 2018;97(2):148-154.
 38. Al-Obaidi R, Salehi H, Desoutter A, Tassery H, Cuisinier F. Formation and assessment of enamel subsurface lesions in vitro. *J Oral Sci*. 2019;61(3):454-458.
 39. Alsayed EZ, Hariri I, Sadr A, et al. Optical coherence tomography for evaluation of enamel and protective coatings. *Dent Mater J*. 2015;34(1):98-107.
 40. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*. 1994;308(6943):1552.
 41. Amaechi BT, Higham SM. Quantitative light-induced fluorescence: a potential tool for general dental assessment. *J Biomed Opt*. 2002;7(1):7-13.
 42. Amaechi BT. Remineralisation - the buzzword for early MI caries management. *Br Dent J*. 2017;223(3):173-182.
 43. Anastasova, R., M. Marinova – Takorova, V. Panov. Changes in values measured with a laserfluorescence system for enamel and dentin etched for different time intervals – pilot study. *Journal of IMAB* 2014 20(1): 517-519.

44. Ando M, Eckert GJ, Stookey GK, Zero DT. Effect of imaging geometry on evaluating natural white-spot lesions using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res.* 2004;38(1):39-44.
45. Ando M, González-Cabezas C, Isaacs RL, Eckert GJ, Stookey GK. Evaluation of several techniques for the detection of secondary caries adjacent to amalgam restorations. *Caries Res.* 2004;38(4):350-356.
46. Ando M, van Der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res.* 2001;35(6):464-470.
47. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71 Spec No:924-928.
48. Arnaud TM, de Barros Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. *J Dent.* 2010;38(11):848-852.
49. Atsawasuwan P, Lu X, Ito Y, et al. Expression and function of enamel-related gene products in calvarial development. *J Dent Res.* 2013;92(7):622–628.
50. Baelum V, Fejerskov O. Caries diagnosis: 'a mental resting place on the way to intervention?'. *Dental Caries - The Disease and its Clinical Management.* London, Blackwell Publishing, 2003. pp. 101-11.
51. Baez RJ, Marthaler TM: *Basic Methods for Assessment of Renal Fluoride Excretion in Community Prevention Programmes for Oral Health.* Geneva, World Health Organization, 2014.
52. Bailey DL, Adams GG, Tsao CE, et al. Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. *J Dent Res.* 2009;88(12):1148-1153.
53. Ball IA. The “fluoride syndrome”: occult caries? *Br Dent J.* 1986;160(3):75-6.
54. Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* 2011;23(6):690-718.
55. Beerens MW, van der Veen MH, van Beek H, ten Cate JM. Effects of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate paste on white spot lesions and dental plaque after orthodontic treatment: a 3-month follow-up. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(6):610-617.
56. Belser U, Spörri S, Mühlemann HR. Uptake and retention of fluoride by intact and etched enamel. *Helv Odontol Acta.* 1975;19(2):69-71.
57. Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(5):589-596.

58. Beniash E, Metzler RA, Lam RS, Gilbert PU. Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel [published correction appears in *J Struct Biol.* 2009 Jul;167(1):95]. *J Struct Biol.* 2009;166(2):133-143.
59. Benson PE, Parkin N, Dyer F, Millett DT, Furness S, Germain P. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 12(12):CD003809.
60. Bhushan B. Biomimetics: lessons from nature--an overview. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2009;367(1893):1445-1486.
61. Bleek K, Taubert A. New developments in polymer-controlled, bioinspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution. *Acta Biomater.* 2013; 9:6283-6321.
62. Boersma JG, van der Veen MH, Lagerweij MD, Bokhout B, Prahl-Andersen B. Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: influencing factors. *Caries Res.* 2005;39(1):41-47.
63. Bonchev A, Simeonov M, Vasileva R. Review: Biomimetic approach for remineralization of human enamel. *IJSR.* 2018; 7(10):1416-1420.
64. Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova, E. et al. Self-assembling Peptide P11-4: A Biomimetic Agent for Enamel Remineralization. *Int J Pept Res Ther* (2020).
65. Bröchner A, Christensen C, Kristensen B, et al. Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig.* 2011;15(3):369-373.
66. Bröseler F, Tietmann C, Bommer C, Drechsel T, Heinzl-Gutenbrunner M, Jepsen S. Randomised clinical trial investigating self-assembling peptide P11-4 in the treatment of early caries. *Clin Oral Investig.* 2020;24(1):123-132.
67. Brunton PA, Davies RP, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, Kirkham J: Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides – a clinical safety trial. *Br Dent J* 2013; 215(4):E6.
68. Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. *Caries Res.* 2008;42(3):157-163.
69. Buchwald T, Buchwald Z. Assessment of the Raman spectroscopy effectiveness in determining the early changes in human enamel caused by artificial caries. *Analyst.* 2019;144(4):1409-1419.
70. Budz JA, Lo Re M, Nancollas GH. The influence of high- and low-molecular-weight inhibitors on dissolution kinetics of hydroxyapatite and

- human enamel in lactate buffers: a constant composition study. *J Dent Res.* 1988;67(12):1493-1498.
71. Bulla, Juliana Gomez. Detection, diagnosis and management of the early carious lesion.(2013).
 72. Busch S. Regeneration of human tooth enamel. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(11):1428-1431.
 73. Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res.* 1985;19(6):490-496.
 74. Butun V, Armes SP, Billingham NC. Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers. *Polymer.* 2001; 42:5993–6008.
 75. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(5):493-502.
 76. Byeon SM, Lee MH, Bae TS. The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor Dent Endod.* 2016;41(2):121-129.
 77. Campos I, Ramírez G, VillaVelázquez C, et al. Study of microcracks morphology produced by Vickers indentation on AISI 1045 borided steels, *Materials Science and Engineering* 2008; 475(1–2):285-292.
 78. Cao Y, Mei ML, Li QL, Lo EC, Chu CH. Enamel prism-like tissue regeneration using enamel matrix derivative. *J Dent.* 2014;42(12):1535-1542.
 79. Cao Y, Mei ML, Li QL, Lo EC, Chu CH. Methods for Biomimetic Mineralisation of Human Enamel: A Systematic Review. *Materials (Basel).* 2015;8(6):2873-2886.
 80. Chang Y, Chang WJ, Shih YJ, Wei TC, Hsiue GH. Zwitterionic sulfobetaine-grafted poly(vinylidene fluoride) membrane with highly effective blood compatibility via atmospheric plasma-induced surface copolymerization. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(4):1228-1237.
 81. Chen L, Liang K, Li J, Wu D, Zhou X, Li J. Regeneration of biomimetic hydroxyapatite on etched human enamel by anionic PAMAM template in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58(8):975-980.
 82. Chen M, Yang J, Li J, et al. Modulated regeneration of acid-etched human tooth enamel by a functionalized dendrimer that is an analog of amelogenin. *Acta Biomater.* 2014;10(10):4437-4446.
 83. Cheng L, Li J, Hao Y, Zhou X. Effect of compounds of *Galla chinensis* on remineralization of enamel surface in vitro. *Arch Oral Biol.* 2010;55(6):435-440.

84. Cheng L, Li J, Hao Y, Zhou X. Effect of compounds of *Galla chinensis* and their combined effects with fluoride on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *J Dent.* 2008;36(5):369-373.
85. Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:38-45.
86. Chien Y, Burwell A, Saeki K. et al. Distinct decalcification process of dentin by different cariogenic organic acids: Kinetics, ultrastructure and mechanical properties. *Arch. Oral Biol.* 2016, 63, 93–105.
87. Chu J, Feng X, Guo H, Zhang T, Zhao H, Zhang Q. Remineralization Efficacy of an Amelogenin-Based Synthetic Peptide on Carious Lesions. *Front Physiol.* 2018;9:842.
88. Chuenarrom, C., et al. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Mat. Res.* 2009; 12(4):473-6.
89. Chung HY, Huang KC. Effects of peptide concentration on remineralization of eroded enamel. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;28:213-221.
90. Chung HY, Li CC, Hsu CC. Characterization of the effects of 3DSS peptide on remineralized enamel in artificial saliva. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;6:74-79.
91. Chung HY, Li CC. Microstructure and nanomechanical properties of enamel remineralized with asparagine-serine-serine peptide. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(2):969-973.
92. Cölfen H, Antonietti M. Polymer-Controlled Biomimetic Mineralization of Novel Inorganic Materials. *Met. Ions Life Sci.* 2008; 4:607–643.
93. Cross K, Huq N, Reynolds E. Casein Phosphopeptides in Oral Health - Chemistry and Clinical Applications. *Current Pharmaceutical Design* 2007; 13(8):793-800.
94. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 2002;47(4):281-291.
95. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clin Oral Investig.* 2016;20(8):1981-1985.
96. Da Rocha DN, Da Silva MHP, De Campos JB, Marçal RLSB, Mijares DQ, Coelho PG et al. Kinetics of conversion of brushite coatings to hydroxyapatite in alkaline solution. *Journal of Materials Research and Technology.* 2018; 7(4):479-486.

97. Dai LL, Mei ML, Chu CH, Lo ECM. Mechanisms of Bioactive Glass on Caries Management: A Review. *Materials* (Basel). 2019;12(24):4183.
98. Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent*. 2015;43(7):806-813.
99. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig*. 2014;18(4):1119-1127.
100. de Groot JF, Borggreven JM, Driessens FC. Some aspects of artificial caries lesion formation of human dental enamel in vitro. *J Biol Buccale*. 1986;14(2):125-131.
101. de Josselin de Jong E, Sundström F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Månsson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res*. 1995;29(1):2-7.
102. de Marsillac Mde W, Vieira Rde S. Assessment of artificial caries lesions through scanning electron microscopy and cross-sectional microhardness test. *Indian J Dent Res*. 2013;24(2):249-254.
103. de Oliveira BH, Dos Santos AP. Semiannual Fluoride Applications in Low-Risk Toddlers May Not Be More Effective Than Toothbrushing Instruction and Dietary Counseling in Controlling Dental Caries. *J Evid Based Dent Pract*. 2016;16(4):246-248.
104. Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J et al. The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. *Biochemistry*. 2009;48(10):2272-2281.
105. Denis M, Atlan A, Vennat E, Tirlet G, Attal JP. White defects on enamel: Diagnosis and anatomopathology: Two essential factors for proper treatment (part 1) *Int Orthod*. 2013;11:139–65.
106. Dessombz A, Lignon G, Picaut L, Rouzière S, Berdal A. Mineral studies in enamel, an exemplary model system at the interface between physics, chemistry and medical sciences. *Comptes Rendus Chimie*. 2016; 19(11–12): 1656-1664.
107. Dimova E, Doichinova L, Andreeva-Borisova R. Dentists` Awareness of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Medinform*. 2020;7(1):1156-1164.
108. Diniz M, Leme A, Cardoso Kde S et al. The efficacy of laser fluorescence to detect in vitro demineralization and remineralization of smooth enamel surfaces. *Photomed Laser Surg* 2009;27:57-61.

109. Diniz MB, Eckert GJ, González-Cabezas C, Cordeiro Rde C, Ferreira-Zandona AG. Caries Detection around Restorations Using ICDAS and Optical Devices. *J Esthet Restor Dent*. 2016;28(2):110-121.
110. Dionysopoulos D, Koliniotou-Koumpia E, Tolidis K, Gerasimou P. Effect of fluoride treatments on bleached enamel microhardness and surface morphology. *Oral Health Prev Dent*. 2017;15(2):169–75.
111. Dorozhkin SV, Epple M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chem*. 2002; 114:3260–3277.
112. Duttagupta DS, Jadhav VM, Kadam VJ. Chitosan: a propitious biopolymer for drug delivery. *Curr Drug Deliv*. 2015;12(4):369-381.
113. Dye B, Vargas C, Fryar C et al. Oral health status of children in Los Angeles County and in the United States, 1999–2004. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2017; 45(2): 135–44.
114. Eimar H, Ghadimi E, Marelli B, et al. Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. *Acta Biomater*. 2012;8(9):3400-3410.
115. Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJ, Qvist V. Detection and activity assessment of primary coronal caries lesions: a methodologic study. *Oper Dent*. 2007;32(3):225-235.
116. Ekstrand KR, Zero DT, Martignon S, Pitts NB. Lesion activity assessment. *Monogr Oral Sci*. 2009;21:63–90.
117. El Moshy S, Abbass MMS, El-Motayam AM. Biomimetic remineralization of acid etched enamel using agarose hydrogel model. *F1000Res*. 2018;7:1476.
118. Elkassas D, Arafa A. Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *J Dent*. 2014;42(4):466-474.
119. Elsharkawy S, Mata A. Hierarchical Biomineralization: from Nature's Designs to Synthetic Materials for Regenerative Medicine and Dentistry. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(18):e1800178.
120. Facetti M, Elizabeth C. Association between visual characterization of root caries and histological severity in vitro. MS (Master of Science) thesis. University of Iowa; 2010.
121. Fan M, Zhang M, Xu HHK, et al. Remineralization effectiveness of the PAMAM dendrimer with different terminal groups on artificial initial enamel caries in vitro. *Dent Mater*. 2020;36(2):210-220.
122. Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*. 2009;30(4):478-483.

123. Fan Y, Wen ZT, Liao S, et al. Novel amelogenin-releasing hydrogel for remineralization of enamel artificial caries. *J Bioact Compat Polym*. 2012;27(6):585-603.
124. Fang P, Conway J, Margolis H, et al. Hierarchical self-assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. *PNAS*. 2011; 108(34):14097-14102.
125. Favretto CO, Danelon M, Castilho FC, Vieira AE, Delbem AC. In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. *Caries Res*. 2013;47(5):532-538.
126. Featherstone JD, Domejean-Orliaguet S, Jenson L, Wolff M, Young DA. Caries risk assessment in practice for age 6 through adult. *J Calif Dent Assoc*. 2007;35(10):703-713.
127. Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in-vitro caries simulation on human tooth enamel. *Arch Oral Biol*. 1979;24(2):101-112.
128. Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. Crystallographic changes in human tooth enamel during in-vitro caries simulation. *Arch Oral Biol*. 1978;23(5):405-413.
129. Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res*. 1981;15(5):377-385.
130. Featherstone JD, Zero DT. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res*. 1992;71 Spec No:804-810.
131. Featherstone JD. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No C:C39-C42.
132. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(7):887-899.
133. Featherstone JD, Fontana M, Wolff M. Novel Anticaries and Remineralization Agents: Future Research Needs. *J Dent Res*. 2018;97(2):125-127.
134. Fejerskov O, Kidd E. Dental caries, the disease and its clinical management. Blackwell, Munksgaard 2004.
135. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004; 38(3): 182–191.
136. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):5-12.

137. Fernández-Ferrer L, Vicente-Ruíz M, García-Sanz V, et al. Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions: A systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2018;149(9):778-786.e2.
138. Ferracane J, Hilton T. Polymerization stress—Is it clinically meaningful? *Dent. Mater.* 2016; 32(1):1–10.
139. Ferreira Zandoná A, Longbottom C Detection and Assessment of Dental Caries A Clinical Guide. Springer;2019.
140. Ferreira Zandoná A, Santiago E, Eckert G, Fontana M, Ando M, Zero DT. Use of ICDAS combined with quantitative light-induced fluorescence as a caries detection method. *Caries Res.* 2010;44(3):317–322.
141. Ferreira Zandoná AG, Stookey GK, Eggertsson H, Wefel J, Katz B, Ofner S, Eckert G: Clinical validation study of QLF at Indiana; in Stookey GK (ed): Proceedings of the 6th Annual Indiana Conference. Indiana University School of Dentistry, 2003, vol 6, pp 237–252.
142. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126(3):270-299.
143. Firth A, Aggeli A, Burke JL, Yang X, Kirkham J. Biomimetic self-assembling peptides as injectable scaffolds for hard tissue engineering. *Nanomedicine (Lond).* 2006;1(2):189-199.
144. Fletcher J, Walsh D, Fowlerb C, Mann S. Electrospun mats of PVP/ACP nanofibres for remineralization of enamel tooth surfaces. *CrystEngComm.* 2011;13(11):3692-3697.
145. Fontana M, Platt JA, Eckert GJ, et al. Monitoring of sound and carious surfaces under sealants over 44 months. *J Dent Res.* 2014;93(11):1070-1075.
146. Frank RM. Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *J Dent Res.* 1990;69 Spec No:559-636.
147. Freire IR, Pessan JP, Amaral JG, Martinhon CC, Cunha RF, Delbem AC. Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: A randomized, controlled trial. *J Dent.* 2016;50:37-42.
148. Gatti A, Camargo LB, Imperato JCP, Mendes FM, Raggio DP. Combination effect of fluoride dentifrices and varnish on deciduous enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2011;25(5):433–38.
149. Ge J, Cui F, Wang X, Feng H. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials.* 2005 ;26(16):3333-3339.
150. Gomez, J, Tellez, M, Pretty, IA, Ellwood, RP, Ismail, AI. Non-cavitated carious lesions detection methods: a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2013; 41(1):55– 73.

151. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):55-59.
152. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod.* 1982;81(2):93-98.
153. Goršeta K, Ambarkova V, Skrinjarić T, Glavina D. Influence of Dentifrices pH on Enamel Microhardness In Vitro. *Coll Antropol.* 2015;39(2):427-431.
154. Gu Z, Yuan Y, He J, et al. Facile approach for DNA encapsulation in functional polyion complex for triggered intracellular gene delivery: design, synthesis and mechanism. *Langmuir.* 2009; 25:5199–5208.
155. Guclu ZA, Alacam A, Coleman NJ: A 12-week assessment of the treatment of white spot lesions with CPP-ACP paste and/or fluoride varnish. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8357621.
156. Gugrani N, Pandit IK, Srivastava N, Gupta M, Sharma M. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011;4(2):93-100.
157. Guzmán-Armstrong S, Chalmers J, Warren JJ. Ask us. White spot lesions: prevention and treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(6):690-696.
158. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol.* 2001;46(2):173-183.
159. Haikel Y, Frank RM, Voegel JC. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. *Caries Res.* 1983;17(1):1-13.
160. Hall AF, DeSchepper E, Ando M, Stookey GK. In vitro studies of laser fluorescence for detection and quantification of mineral loss from dental caries. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):507-514.
161. Hamba H, Nikaido T, Sadr A, et al. Enamel lesion parameter correlations between polychromatic micro-CT and TMR. *J Dent Res* 2012; 91: 586–591.
162. Han SY, Kim BR, Ko HY, Kwon HK, Kim BI. Validity and reliability of autofluorescence-based quantification method of dental plaque. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(4):587-591.
163. Hanaizumi Y, Yokota R, Domon T, Wakita M, Kozawa Y. The initial process of enamel prism arrangement and its relation to the Hunter-Schreger bands in dog teeth. *Arch Histol Cytol.* 2010;73(1):23-36.

164. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(8):565-569.
165. Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Zero DT. The effect of human saliva substitutes in an erosion–abrasion cycling model. *European Journal of Oral Sciences* 2008;116:552–6.
166. He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11649-11656.
167. He W, Bhole SD, Chen D. Modeling the dependence of strength on grain sizes in nanocrystalline materials. *Sci Technol Adv Mater.* 2008;9(1):015003.
168. Hegde MN, Darshana D, Qaiser S,. Remineralising Agents: An Updated Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2020; 11(1):181-188.
169. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(11):967-978.
170. Heravi F, Ahrari F, Tanbakuchi B. Effectiveness of MI Paste Plus and Remin Pro on remineralization and color improvement of postorthodontic white spot lesions. *Dent Res J (Isfahan).* 2018;15(2):95-103.
171. Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(2):85-95.
172. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent.* 2003;28(1):47-52.
173. Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *J Dent.* 2011;39(5):391-396.
174. Höchli D, Hersberger-Zurfluh M, Papageorgiou SN, Eliades T. Interventions for orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod.* 2017;39(2):122-133.
175. Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N, Yamada T. Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *J Dent Res.* 1994;73(12):1853-1857.
176. Hsu BB, Klibanov AM. Light-activated covalent coating of cotton with bactericidal hydrophobic polycations. *Biomacromolecules.* 2011;12(1):6-9.
177. Hsu CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B. Influence of 8DSS peptide on nano-mechanical behavior of human enamel. *J Dent Res.* 2011;90(1):88-92.

178. Hsu CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B. Influences of ionic concentration on nanomechanical behaviors for remineralized enamel. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(8):1982-1989.
179. Hu Y. et al. MMP20, KLK4, and MMP20/KLK4 double null mice define roles for matrix proteases during dental enamel formation. *Mol. Genet. Genom. Med.* 2016 4(2), 178–196.
180. Huang GJ, Roloff-Chiang B, Mills BE, Shalchi S, Spiekerman C, Korpak AM, Starrett JL, Greenlee GM, Drangsholt RJ, Matunas JC: Effectiveness of MI Paste Plus and PreviDent fluoride varnish for treatment of white spot lesions: a randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013; 143: 31–41.
181. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011;45(5):460-468.
182. Huang X, Deng M, Liu M, et al. Comparison of Composition and Anticaries Effect of Galla Chinensis Extracts with Different Isolation Methods. *Open Dent J.* 2017;11:447-459.
183. Huang XL, Liu MD, Li JY, Zhou XD, ten Cate JM. Chemical composition of Galla chinensis extract and the effect of its main component(s) on the prevention of enamel demineralization in vitro. *Int J Oral Sci.* 2012;4(3):146-151.
184. Huth KC, Lussi A, Gygax M, et al. In vivo performance of a laser fluorescence device for the approximal detection of caries in permanent molars. *Journal of Dentistry.* 2010 Dec;38(12):1019-1026.
185. Huth KC, Neuhaus KW, Gygax M, et al. Clinical performance of a new laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions in permanent molars. *J Dent.* 2008;36(12):1033-1040.
186. Iijima M, Moradian-Oldak J. Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix. *Biomaterials.* 2005;26(13):1595-1603.
187. Ionita I. Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy. *Romanian Reports in Physics.* 2009 61(3):567–574.
188. Ismail AI, Pitts NB, Tellez M, Banerjee A, Deery C, et al. The International Caries Classification and Management System (ICCMS™) an example of a caries management pathway. *BMC Oral Health.* 2015;15(Suppl 1):S9.
189. Ismail AI, Sohn W, Lim S, Willem JM. Predictors of dental caries progression in primary teeth. *J Dent Res.* 2009;88(3):270-275.

190. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-178.
191. Ismail AI, Tellez M, Pitts N, Ekstrand K, Ricketts D et al. Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013; 41(1):e12–40.
192. Jablonski-Momeni A, Heinzl-Gutenbrunner M. Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in constructing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *J Orofac Orthop.* 2014;75(3):175-190.
193. Jablonski-Momeni A, Korbmacher-Steiner H, Heinzl-Gutenbrunner M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P. Randomised in situ clinical trial investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. *Sci Rep.* 2019;9(1):269.
194. Jablonski-Momeni A, Ricketts DN, Rolfsen S et al. Performance of laser fluorescence at tooth surface and histological section. *Lasers Med Sci* 2011;26:171-8.
195. Jana S, Rannard S, Cooper A. Structure–LCST relationships for end-functionalized water-soluble polymers: an “accelerated” approach to phase behaviour studies. *Chem. Commun.* 2007; 28: 2962–2964.
196. Jayasudha, Baswaraj, H K N, K B P. Enamel regeneration - current progress and challenges. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(9):ZE06-ZE9.
197. Jefferies SR. Advances in remineralization for early carious lesions: a comprehensive review. *Compend Contin Educ Dent.* 2014;35(4):237-244.
198. Jiang S, Cao Z. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv Mater.* 2010;22(9):920-932.
199. Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Lei L, Zhao Z. Effect of fixed orthodontic treatment on oral microbiota and salivary proteins. *Exp Ther Med.* 2019;17(5):4237-4243.
200. Jones J, Clare A. *Bioglasses: An Introduction.* John Wiley Sons, 2012.
201. Juárez-López ML, Hernández-Palacios RD, Hernández-Guerrero JC, Jiménez-Farfán D, Molina-Frechero N. Efecto preventivo y de remineralización de caries incipientes del fosfopeptido de caseina fosfato de calcio amorfo [Preventive and remineralization effect over incipient lesions of caries decay by phosphopeptide-amorphous calcium phosphate]. *Rev Invest Clin.* 2014;66(2):144-151.

202. Jun MK, Ku HM, Kim E, Kim HE, Kwon HK, Kim BI. Detection and Analysis of Enamel Cracks by Quantitative Light-induced Fluorescence Technology. *J Endod.* 2016;42(3):500-504.
203. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Comparative evaluation of remineralizing efficacy of biomimetic self-assembling peptide on artificially induced enamel lesions: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2018;21(5):536-541.
204. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *J Clin Exp Dent.* 2020;12(2):e161-e168.
205. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker ER, Frederick KE. Preparation, characterization and in vitro efficacy of an acid-modified beta-TCP material for dental hard-tissue remineralization. *Acta Biomater.* 2010;6(3):969-978.
206. Karlsson L, Lindgren LE, Trollsås K, Angmar-Månsson B, Tranaeus S. Effect of supplementary amine fluoride gel in caries-active adolescents. A clinical QLF study. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(5):284-291.
207. Karlsson L. Caries Detection Methods Based on Changes in Optical Properties between Healthy and Carious Tissue. *Int J Dent.* 2010;2010:270729.
208. Katakam D, Priyadarshini Sh, Raghu R, et al. An in vitro comparative evaluation of enamel microhardness in soft drinks, CPP-ACP, amine fluoride and sodium fluoride with functionalised tricalcium phosphate. *J. Evolution Med. Dent. Sci.* 2017;6(4):273-7.
209. Kayser V, Turton DA, Aggeli A, Beevers A, Reid GD, Beddard GS. Energy migration in novel pH-triggered self-assembled beta-sheet ribbons. *J Am Chem Soc.* 2004; 126(1):336–43.
210. Keely S, Ryan SM, Haddleton DM, et al. Dexamethasone-pDMAEMA polymeric conjugates reduce inflammatory biomarkers in human intestinal epithelial monolayers. *J Control Release.* 2009;135(1):35-43.
211. Khalife MA, Boynton JR, Dennison JB, Yaman P, Hamilton JC. In vivo evaluation of diagnodent for the quantification of occlusal dental caries. *Oper Dent* 2009; 34(2):136–141.
212. Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemp Clin Dent.* 2017;8(1):11-19.
213. Kim HE, Kim BI. Analysis of Orange/Red Fluorescence for Bacterial Activity in Initial Carious Lesions May Provide Accurate Lesion Activity Assessment for Caries Progression. *J Evid Based Dent Pract.* 2017;17(2):125-128.

214. Kim HE, Kwon HK, Kim BI. Recovery percentage of remineralization according to severity of early caries. *Am J Dent*. 2013;26(3):132-136.
215. Kim IH, Son JS, Min BK, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. A simple, sensitive and non-destructive technique for characterizing bovine dental enamel erosion: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Int J Oral Sci*. 2016;8(1):54-60.
216. Kind L, Stevanovic S, Wuttig S, Wimberger S, Hofer J, Müller B, Piele U. Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. *J Dent Res*. 2017;96(7):790-797.
217. Kirkham J, Firth A, Vernals D, et al. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res*. 2007;86(5):426-430.
218. Klein OD, Duverger O, Shaw W, et al. Meeting report: a hard look at the state of enamel research. *Int J Oral Sci*. 2017;9(11):e3.
219. Knösel M, Forslund L, Jung K, Ziebolz D. Efficacy of different strategies in protecting enamel against demineralization during fixed orthodontic treatment. *J Orofac Orthop*. 2012;73(3):194-203.
220. Ko HY, Kang SM, Kim HE, Kwon HK, Kim BI. Validation of quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) for the detection of approximal caries in vitro. *J Dent*. 2015;43(5):568-575.
221. König K, Flemming G, Hibst R. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998;44(8):1293-1300.
222. Kooshki F, Pajooan S, Kamareh S. Effects of treatment with three types of varnish remineralizing agents on the microhardness of demineralized enamel surface. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(7):e630-e635.
223. Krithikadatta J, Fredrick C, Abarajithan M, Kandaswamy D. Remineralisation of occlusal white spot lesion with a combination of 10% CPP-ACP and 0.2% sodium fluoride evaluated using Diagnodent: a pilot study. *Oral Health Prev Dent*. 2013;11(2):191-196.
224. Kudaibergenov W, Jaeger, Laschewsky A. Polymeric betaines: synthesis, characterization and application. *Adv Polym Sci* 2006; 201:157–224.
225. Kyle S, Aggeli A, Ingham E, McPherson MJ. Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(36):9395-9405.
226. Lalani J, Misra A, 4 - Gene Delivery Using Chemical Methods, Editor(s): Ambikanandan Misra, Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics, Elsevier, 2011.
227. Le Norcy E, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, et al. Leucine-rich amelogenin peptides regulate mineralization in vitro. *J Dent Res*. 2011;90(9):1091-1097.

228. Lee ES, de Josselin de Jong E, Jung HI, Kim BI. Red fluorescence of dental biofilm as an indicator for assessing the efficacy of antimicrobials. *J Biomed Opt.* 2018;23(1):1-6.
229. Lee YK. Fluorescence properties of human teeth and dental calculus for clinical applications. *J Biomed Opt.* 2015;20(4):040901.
230. Li J, Xie X, Wang Y, et al. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: a systematic review. *J Dent.* 2014;42(7):769-777.
231. Li L, Mao C, Wang J, et al. Bio-inspired enamel repair via Glu-directed assembly of apatite nanoparticles: an approach to biomaterials with optimal characteristics. *Adv Mater.* 2011;23(40):4695-4701.
232. Li QL, Ning TY, Cao Y, Zhang WB, Mei ML, Chu CH. A novel self-assembled oligopeptide amphiphile for biomimetic mineralization of enamel. *BMC Biotechnol.* 2014;14:32.
233. Limer AJ, Rullay AK, Miguel VS, et al. Fluorescently tagged star polymers by living radical polymerisation for mucoadhesion and bioadhesion. *Funct Polym* 2006; 66:51–64.
234. Lin S, Wu J, Jia H, et al.. Facile preparation and antibacterial properties of cationic polymers derived from 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. *RSC Adv* 2013; 3(43):20758–2076.
235. Line S. The development and evolution of mammalian enamel: structural and functional aspects. *Braz J Morphol.* 2005;22(2):67–72.
236. Liu G, Wu D, Ma C. et al. Insight into the Origin of the Thermosensitivity of Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]. *ChemPhys-Chem* 2007; 8:2254–2259.
237. Liu P, Song J. Sulfobetaine as a zwitterionic mediator for 3D hydroxyapatite mineralization. *Biomaterials.* 2013;34(10):2442-2454.
238. Llana C, Leyda AM, Forner L. CPP-ACP and CPP-ACFP versus fluoride varnish in remineralisation of early caries lesions. A prospective study. *Eur J Paediatr Dent.* 2015;16(3):181-186.
239. Lopes C, Limirio P, Novais V, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2018; 53(9):747-769.
240. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials.* 2005;26(10):1097-1108.
241. Lu Y. et al. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol. Chem.* 2008; 389(6), 695–700.
242. Lundström F, Krasse B. Caries incidence in orthodontic patients with high levels of *Streptococcus mutans*. *Eur J Orthod.* 1987;9(2):117-121.

243. Lussi A, Hack A, Hug I, Heckenberger H, Megert B, Stich H. Detection of approximal caries with a new laser fluorescence device. *Caries Res.* 2006;40(2):97-103.
244. Lussi A, Hellwig E. Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *J Dent.* 2006;34(7):467-471.
245. Lutz R, Neukam FW, Simion M, Schmitt CM. Long-term outcomes of bone augmentation on soft and hard-tissue stability: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26 Suppl 11:103-122.
246. Lynch RJ, Ten Cate JM. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. *Caries Res.* 2006;40(6):530-535.
247. Magennis, E, Francini N, Mastrotto F, Catania R. et al. Polymers for binding of the gram-positive oral pathogen *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2017 Jul 3;12(7):e0180087.
248. Maheswari SU, Raja J, Kumar A, Seelan RG. Caries management by risk assessment: A review on current strategies for caries prevention and management. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(Suppl 2):S320-S324.
249. Mai T, Boye S, Yuan J, et al. Poly(ethylene oxide)-based block copolymers with very high molecular weights for biomimetic calcium phosphate mineralization. *RSC Adv.* 2015;5(125):103494-103505.
250. Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):2141-2146.
251. Manton DJ. Diagnosis of the early carious lesion. *Aust Dent J.* 2013;58 Suppl 1:35-39.
252. Marinho VC, Chong LY, Worthington HV, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;7(7):CD002284.
253. Marinova – Takorova, M., R. Anastasova, V. Panov, S. Yanakiev. Comparative evaluation of the effectiveness of three methods for proximal caries diagnosis – a clinical study. *Journal of IMAB* 2014 20(1): 514-516.
254. Marinova – Takorova, M., R. Anastasova, V. Panov. Comparative evaluation of the effectiveness of five methods for early diagnosis of occlusal caries lesions. *Journal of IMAB* 2014 20(3): 533-536.
255. Marinova-Takorova M, Panov VE, Anastasova R. Effectiveness of near-infrared transillumination in early caries diagnosis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* 2016; 30(6):1207-1211.

256. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009;54(12):1111-1117.
257. Martinez-Avila O, Wu S, Kim SJ, et al. Self-assembly of filamentous amelogenin requires calcium and phosphate: from dimers via nanoribbons to fibrils. *Biomacromolecules.* 2012;13(11):3494-3502.
258. Mattousch TJ, van der Veen MH, Zentner A. Caries lesions after orthodontic treatment followed by quantitative light-induced fluorescence: a 2-year follow-up. *Eur J Orthod.* 2007;29(3):294-298.
259. Maude S, Ingham E, Aggeli A. Biomimetic self-assembling peptides as scaffolds for soft tissue engineering. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(5):823-47.
260. McGaughey C, Stowell EC. Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity. *J Dent Res.* 1977;56(6):579-587.
261. Mehta PA, Vimala N, Mandke L. An In Vivo Study of Different Methods of Detection and Quantification of Occlusal Dental Caries in Permanent Molars. *Indian J Oral Health Res* 2015;1(1):15-9.
262. Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. *Caries Res.* 2003;37(6):442-444.
263. Mendes M, Nicolau J. Utilization of laser fluorescence to monitor caries lesions development in primary teeth. *J Dent Child (Chic)* 2004;71:139-42.
264. Mohanraj M, Prabhu V R, Senthil R. Diagnostic methods for early detection of dental caries - A review. *Int J Pedod Rehabil* 2016;1(1):29-36.
265. Molaasadolah F, Eskandarion S, Ehsani A, Sanginan M. In Vitro Evaluation of Enamel Microhardness after Application of Two Types of Fluoride Varnish. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(8):ZC64-ZC66.
266. Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol.* 2001;20(5-6):293-305.
267. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:1996-2023.
268. Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CE, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP-ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res.* 2008;42(3):171-184.

269. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res.* 2013;47(2):162-170.
270. Nagano, T. et al. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. *J. Dent. Res.* 2009;88(9):823–828.
271. Najibfard K, Ramalingam K, Chedjieu I, Amaechi BT. Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. *J Clin Dent.* 2011;22(5):139-143.
272. Nyrkova IA, Semenov AN, Aggeli A, Bell M, Boden N, McLeish TC. Self-assembly and structure transformations in living polymers forming fibrils. *Eur Phys J B.* 2000; 17(3):499–513.
273. Nyvad B, Baelum V. Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research. *Caries Res.* 2018;52(5):397-405.
274. Nyvad B, Fejerskov, O., Baelum, V. . Visual-tactile caries diagnosis. In: Fejerskov O, Kidd, E., editor. *Dental Caries: The disease and its clinical management*: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 49-69.
275. Oliveira P, Fonseca A, Silva EM, Coutinho T, Tostes MA. Remineralizing potential of CPP-ACP creams with and without fluoride in artificial enamel lesions. *Aust Dent J.* 2016;61(1):45-52.
276. Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, et al. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol.* 2008;53(3):257-260.
277. Özgül BM, Tirali RE, Cehreli SB. Effect of Biodentine on secondary caries formation: An in vitro study. *Am J Dent.* 2016;29(2):71-74.
278. Paglia L. Pit and fissure sealants or fluoride varnishes?. *Eur J Paediatr Dent.* 2016;17(3):173.
279. Palmer L, Newcomb C, Kaltz S, Spoerke E, Stupp S. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev.* 2008;108(11):4754-4783.
280. Pandya M, Diekwisch, TG. Enamel biomimetics-fiction or future of dentistry. *Int J Oral Sci.* 2019; 11(8):1-9.
281. Pandya M, Lin T, Li L, et al. Posttranslational Amelogenin Processing and Changes in Matrix Assembly during Enamel Development. *Front Physiol.* 2017;8:790.
282. Panich M, Poolthong S. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on in vitro enamel hardness. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(4):455-460.
283. Pecheva E, Pramatarova L, Maitz M, Pham M, et al. Kinetics of hydroxyapatite deposition on solid substrates modified by sequential

- implantation of Ca and P ions Part I. FTIR and Raman spectroscopy study. *Applied Surface Science*, 2004; 235(1-2):170-175.
284. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G: Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)* 2014; 5: 108–114.
 285. Petersen PE The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003 Dec;31 Suppl 1:3-23.
 286. Petersson LG, Twetman S, Pakhomov GN. The efficiency of semiannual silane fluoride varnish applications: a two-year clinical study in preschool children. *J Public Health Dent.* 1998;58(1):57-60.
 287. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth?. *Caries Res.* 2018;52(1-2):153-165.
 288. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019;53(3):284-295.
 289. Pitts N. “ICDAS”—an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health.* 2004;21:193–198.
 290. Pitts N. Monographs in oral science—detection, assessment, diagnosis and monitoring of caries. Basel: Karger; 2009.
 291. Pitts NB, Ekstrand KR; ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):e41-e52.
 292. Pitts NB, Stamm JW. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)--final consensus statements: agreeing where the evidence leads. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C125-C128.
 293. Pitts NB, Wright JP: Reminova and EAER: keeping enamel whole through caries remineralization. *Adv Dent Res* 2018; 29(1): 48–54.
 294. Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res.* 2004;38:294–304.
 295. Pramatarova L, Pecheva E, Petrov T, et al. Hydroxyapatite kinetic deposition on solid substrates induced by laser-liquid-solid interaction.

- Proc. SPIE 5830, 13th International School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, 22 April 2005.
296. Preston KP, Smith PW, Higham SM. The influence of varying fluoride concentrations on in vitro remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies. *Arch Oral Biol.* 2008;53(1):20-26.
 297. Pretty IA, Smith PW, Edgar WM, Higham SM. Detection of in vitro demineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescence (QLF). *Dental Materials*, 2003;19 (5):368–374.
 298. Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of dehydration on quantitative light-induced fluorescence analysis of early enamel demineralization. *J Oral Rehabil.* 2004;31(2):179-184.
 299. Pretty IA, Ellwood RP. The caries continuum: opportunities to detect, treat and monitor the re-mineralization of early caries lesions. *J Dent.* 2013;41 Suppl 2:S12-S21.
 300. Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent.* 2006;34(10):727-739.
 301. Quintana M, Gosa D, Janczewski E, et al. Enhanced stability of low fouling zwitterionic polymer brushes in seawater with diblock architecture. *Langmuir.* 2013;29(34): 10859–10867.
 302. Rand Al-Obaidi. In vitro enamel subsurface lesions: characterization and treatment. Human health and pathology. PhD Thesis, Université Montpellier, 2018.
 303. Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent.* 2011;32(6):26-36.
 304. Rao SK, Bhat GS, Aradhya S, Devi A, Bhat M. Study of the efficacy of toothpaste containing casein phosphopeptide in the prevention of dental caries: a randomized controlled trial in 12- to 15-year-old high caries risk children in Bangalore, India. *Caries Res.* 2009;43(6):430-435.
 305. Raue L, Hartmann CD, Rödiger M, Bürgers R, Gersdorff N. Anisotropic local physical properties of human dental enamel in comparison to properties of some common dental filling materials. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(8):591-596.
 306. Ravichandran R , Griffith M , Phopase J . Applications of self-assembling peptide scaffolds in regenerative medicine: the way to the clinic. *J Mater Chem B.* 2014;2(48):8466-8478.
 307. Ravikumar R, Ghufuran R, Santhosh B, et al. Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure, *Applied Spectroscopy Reviews* 2015; 50(4): 332-350.

308. Rechmann P, Chaffee BW, Rechmann BMT, Featherstone JDB. Changes in Caries Risk in a Practice-Based Randomized Controlled Trial. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):15-23.
309. REED BP, REED CI. X-ray diffraction studies on human dental enamel. *Fed Proc.* 1947;6(1 Pt 2):185.
310. Reema SD, Lahiri PK, Roy SS. Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate. *Chin J Dent Res.* 2014;17(1):7-14.
311. Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent.* 2009;37(10):786-790.
312. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat?. *Clin Oral Investig.* 2014;18(7):1711-1718.
313. Reyes-Gasga J, Martínez-Piñero EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(8):4568-4574.
314. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008;87(4):344-348.
315. Richter AE, Arruda AO, Peters MC, Sohn W. Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139(5):657-664.
316. Robertson MA, Kau CH, English JD, Lee RP, Powers J, Nguyen JT. MI Paste Plus to prevent demineralization in orthodontic patients: a prospective randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(5):660-668.
317. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(4):481-495.
318. Robinson C, Shore RC, Wood SR, et al. Subunit structures in hydroxyapatite crystal development in enamel: implications for amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res.* 2003;44(1):65-71.
319. Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variatoon in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res.* 1971;5(1):44-57.
320. Robinson, C., Briggs, H. D., Atkinson, P. J. & Weatherell, J. A. Matrix and mineral changes in developing enamel. *J. Dent. Res.* 1979; 58, 871–882.

321. Robinson, C., Kirkham, J. & Hallsworth, A. S. Volume distribution and concentration of protein, mineral and water in developing bovine enamel. *Arch. Oral. Biol.* 1988; 33: 159–62.
322. Roopa KB, Pathak S, Poornima P, Neena IE. White spot lesions: A literature review. *J Pediatr Dent* 2015;3(1):1-7.
323. Ruan Q, Liberman D, Bapat R, Chandrababu KB, Phark JH, Moradian-Oldak J. Efficacy of amelogenin-chitosan hydrogel in biomimetic repair of human enamel in pH-cycling systems. *J Biomed Eng Inform.* 2016;2(1):119-128.
324. Ruan Q, Moradian-Oldak J. Amelogenin and Enamel Biomimetics. *J Mater Chem B.* 2015;3(16):3112-3129.
325. Ruan Q, Siddiqah N, Li X, Nutt S, Moradian-Oldak J. Amelogenin-chitosan matrix for human enamel regrowth: effects of viscosity and supersaturation degree. *Connect Tissue Res.* 2014;55 Suppl 1(0 1):150-154.
326. Ruan QC, Zhang YZ, Yang XD et al. An amelogenin-chitosan matrix promotes assembly of an enamel-like layer with a dense interface. *Acta Biomater* 2013; 9(7): 7289–7297.
327. Saber-Samandari S, Gross KA. Micromechanical properties of single crystal hydroxyapatite by nanoindentation. *Acta Biomater.* 2009;5(6):2206-2212.
328. Salehi H, Terrer E, Panayotov I, et al. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. *J Biophotonics.* 2013;6(10):765-774.
329. Sangmar-Månsson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. *Caries Res.* 2001;35(1):21-26.
330. Schlee M, Schad T, Koch JH, Cattin PC, Rathe F: Clinical performance of self-assembling peptide P11-4 in the treatment of initial proximal carious lesions: a practice-based case series. *J Investig Clin Dent* 2018; 9:e12286.
331. Schlenoff JB. Zwitteration: coating surfaces with zwitterionic functionality to reduce nonspecific adsorption. *Langmuir.* 2014;30(32):9625-9636.
332. Schmidlin P, Zobrist K, Attin T, Wegehaupt F. In vitro re-hardening of artificial enamel caries lesions using enamel matrix proteins or self-assembling peptides. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(1):31–6.
333. Schwass D, Swain M, Purton D, Leichter J. A system of calibrating microtomography for use in caries research. *Caries Res.* 2009;43(4):314-21.

334. Schweizer S, Taubert A. Polymer-controlled, bio-inspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution. *Macromol Biosci.* 2007;7(9-10):1085-1099.
335. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, et al. In vitro Induction of residual caries lesions in dentin: comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res.* 2015;49(3):259-265.
336. Seppä L. Efficacy and safety of fluoride varnishes. *Compend Contin Educ Dent.* 1999;20(1 Suppl):18-35.
337. Shahid M. Regular supervised fluoride mouthrinse use by children and adolescents associated with caries reduction. *Evid Based Dent* 2017; 18: 11–12.
338. Shen P, Manton DJ, Cochrane NJ, et al. Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent.* 2011;39(7):518-525.
339. Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Månsson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. *Caries Res.* 2001;35(1):21-26.
340. Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. II. Surface morphology of sound enamel and carieslike lesions of enamel. *Quintessence Int.* 1988;19(11):773-785.
341. Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int.* 1988;19(10):683-711.
342. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev.* 1973;3:100-160.
343. Simeonov M, Gussiyska A, Mironova J, Nikolova D, Apostolov A, Sezanova K, Dyulgerova E, Vassileva E. Novel hybrid chitosan/calcium phosphates microgels for remineralization of demineralized enamel – A model study. *Eur. Polym. J.* 2019; 119:14-21.
344. Simmer JP, Richardson AS, Hu YY, Smith CE, Ching-Chun Hu J. A post-classical theory of enamel biomineralization... and why we need one. *Int J Oral Sci.* 2012;4(3):129-134.
345. Singh S, Singh SP, Goyal A, Utreja AK, Jena AK. Effects of various remineralizing agents on the outcome of post-orthodontic white spot lesions (WSLs): a clinical trial. *Prog Orthod.* 2016;17(1):25.
346. Sitthisettapong T, Doi T, Nishida Y, Kambara M, Phantumvanit P. Effect of CPP-ACP Paste on Enamel Carious Lesion of Primary Upper Anterior Teeth Assessed by Quantitative Light-Induced Fluorescence: A One-Year Clinical Trial. *Caries Res.* 2015;49(4):434-441.

347. Sitthisettapong T, Phantumvanit P, Huebner C, Derouen T. Effect of CPP-ACP paste on dental caries in primary teeth: a randomized trial. *J Dent Res.* 2012;91(9):847-852.
348. Skucha-Nowak M, Gibas M, Tanasiewicz M, Twardawa H, Szklarski T. Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(5):891-898.
349. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):128-161.
350. Snead ML, Zeichner-David M, Chandra T, Robson KJ, Woo SL, Slavkin HC. Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(23):7254-7258.
351. Sobel AE, Hanok A, Kirshner HA, Fankuchen I. *J. Biol. Chem.* 1949;179:205–210.
352. Srivastava K, Tikku T, Khanna R, Sachan K. Risk factors and management of white spot lesions in orthodontics. *J Orthod Sci.* 2013;2(2):43-49.
353. Staudt CB, Lussi A, Jacquet J, Kiliaridis S. White spot lesions around brackets: in vitro detection by laser fluorescence. *European Journal of Oral Sciences.* 2004; 112(3):237-243.
354. Stookey GK. Optical methods--quantitative light fluorescence. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C84-C88.
355. Sun M, Wu N, Chen H. Laser-assisted Rapid Mineralization of Human Tooth Enamel. *Sci Rep.* 2017;7(1):9611.
356. Taha AA, Patel MP, Hill RG, Fleming PS. The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review. *J Dent.* 2017;67:9-17.
357. Takahashi F, Kurokawa H, Shibasaki S, Kawamoto R, Murayama R, Miyazaki M. Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(2):142–7.
358. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res.* 2016;50(6):571-578.
359. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. *Caries Res.* 2015;49(4):394-400.
360. Takeshita EM, Exterkate RA, Delbem AC, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. *Caries Res.* 2011;45(5):494-497.

361. Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Norén JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent.* 2010;38(1):72-81.
362. Temel SS, Kaya B. Diagnosis, Prevention and Treatment of White Spot Lesions Related to Orthodontics. *Int J Oral Dent Health.*2019; 5:085.
363. ten Cate JM. Models and role models. *Caries Res* 2015; 49(suppl 1): 3–10.
364. Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylen MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem.* 1980;255(20):9760-9768.
365. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care, “Karies-diagnostik, riskbedomning och icke-invasi behanfling” no. 188:84, 2007.
366. Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 1984;18(1):7-11.
367. Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. Effect of time and degree of saturation of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 1983;17(6):503-512.
368. Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. Effect of time, degree of saturation, pH and acid concentration of buffer solutions on the rate of in-vitro demineralization of human enamel. *Arch Oral Biol.* 1985;30(1):37-42.
369. Thomson BM, Hardaker L, Davies RP, Dennis C, Bronowska A, Aggeli A, Kirkham J, Lysek DA. 2014. P11-15:a biocompatible, selfassemblingpeptide with potential to promote enamel remineralisation. Paper presented at: 61 ORCA Congress; Greifswald, Germany.
370. Todorova V, Filipov I, Petrova R. In Vitro Comparison of Several Methods for Initial Proximal Caries Detection. *Folia Med (Plovdiv).* 2020 Jun 30;62(2):358-364.
371. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent.* 2011;39(6):430-437.
372. Twetman S, Axelsson S, Dahlén G, et al. Adjunct methods for caries detection: a systematic review of literature. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):388-397.
373. Urquhart O, Tampi MP, Pilcher L, et al. Nonrestorative Treatments for Caries: Systematic Review and Network Meta-analysis. *J Dent Res.* 2019;98(1):14-26.

374. Uskoković V. Prospects and Pits on the Path of Biomimetics: The case of tooth enamel. *J Biomim Biomater Tissue Eng.* 2010;8:45-78.
375. Üstün N, Aktören O. Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microsc Res Tech.* 2019 Jul;82(7):1065-1072.
376. Vahid Golpayegani M, Sohrabi A, Biria M, Ansari G. Remineralization Effect of Topical NovaMin Versus Sodium Fluoride (1.1%) on Caries-Like Lesions in Permanent Teeth. *J Dent (Tehran).* 2012;9(1):68-75.
377. van der Veen MH, de Josselin de Jong E. Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesions. *Monogr Oral Sci.* 2000;17:144-162.
378. van der Veen MH, Mattousch T, Boersma JG. Longitudinal development of caries lesions after orthodontic treatment evaluated by quantitative light-induced fluorescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(2):223-228.
379. Vassileva R, Duylgerova E, Gusiyska A, Mironova J, Gyulbenkyan E. Biomimetic Approaches of Dentin Regeneration. *IJSR.* 2016; 5(3):752-755.
380. Volkmer T., Magalhães J, Sousa V, Santos L, et al. 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate/(2-Hydroxyethyl) Methacrylate/ α -Tricalcium Phosphate Cryogels for Bone Repair, Preparation and Evaluation of the Biological Response of Human Trabecular Bone-Derived Cells and Mesenchymal Stem Cells. *Polymers,* 2014;6(10): 2510–25.
381. Vongsavan K, Surarit R, Rirattanapong P. The combined effect of xylitol and fluoride in varnish on bovine teeth surface microhardness. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2014;45(2):505–10.
382. Waller E, van Daelen CJ, van der Veen MH. White paper on Application of QLF™ for Diagnosis and Quality Assessment in Clinical Practice, Version : 11, 2012.
383. Walsh L. Contemporary technologies for remineralization therapies: A review. *International Dentistry SA,* 2009; 11(6):6-16.
384. Walsh L. White spots. Unlock the mystery, identify the problem, find the appropriate treatment solution. *GC Asia Dental Handbook.* Singapore, Singapore; 2007.
385. Walsh LJ. Preventive dentistry for the general dental practitioner. *Aust Dent J.* 2000;45(2):76-82.
386. Walsh LJ: The current status of tooth crèmes for enamel remineralization. *Dental Inc* 2009; 7: 38–41.

387. Wang X, Mihailova B, Klocke A et al. Effect of Artificial Saliva on the Apatite Structure of Eroded Enamel. *International Journal of Spectroscopy* 2011;9(2).
388. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res.* 2012;91(10):979-984.
389. Welk A, Ratzmann A, Reich M, Krey KF, Schwahn C. Effect of self-assembling peptide P11-4 on orthodontic treatment-induced carious lesions. *Sci Rep.* 2020;10(1):6819.
390. Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H: Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res* 2015; 94(2): 261-71.
391. Wilmers J, Bargmann S, Nature's design solutions in dental enamel: Uniting high strength and extreme damage resistance. *Acta Biomaterialia.* 2020;107(2):1-24.
392. Wu D, Yang J, Li J, et al. Hydroxyapatite-anchored dendrimer for in situ remineralization of human tooth enamel. *Biomaterials.* 2013;34(21):5036-5047.
393. Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties. *J Mater Sci.* 2012;47(23):8035-8043.
394. Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, et al. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res.* 1998;77(3):472-480.
395. Xu Y, Walther A, Müller AH. Direct Synthesis of Poly(potassium 3-sulfopropyl methacrylate) Cylindrical Polymer Brushes via ATRP Using a Supramolecular Complex With Crown Ether. *Macromol Rapid Commun.* 2010;31(16):1462-1466.
396. Yagi N, Ohta N, Matsuo T, et al. A Microbeam Small-Angle X-ray Scattering Study on Enamel Crystallites in Subsurface Lesion. *J. Phys.* 2010; Conf. Ser. 247.
397. Yang S, He H, Wang L, Jia X, Feng H. Oriented crystallization of hydroxyapatite by the biomimetic amelogenin nanospheres from self-assemblies of amphiphilic dendrons. *Chem Commun (Camb).* 2011;47(36):10100-10102.
398. Yang X, Sun Z, Ma R, Fan D, Moradian-Oldak J. Amelogenin "nanorods" formation during proteolysis by Mmp-20. *J Struct Biol.* 2011;176(2):220-228.
399. Yang X, Wang L, Qin Y, et al. How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J Phys Chem B.* 2010;114(6):2293-2300.

400. Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(6):321-332.
401. Yılmaz H, Keleş S. Recent Methods for Diagnosis of Dental Caries in Dentistry. *Meandros Med Dent J* 2018;19:1-8
402. Yin W, Hu DY, Li X, et al. The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). *J Dent.* 2013;41 Suppl 2:S22-S28.
403. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J (Basel).* 2017;5(2):20.
404. Zabokova-Bilbilova E, Popovska L, Kapusevska B, Stefanovska E. White spot lesions: prevention and management during the orthodontic treatment. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki).* 2014;35(2):161-168.
405. Zaidi I, Somani R, Jaidka S, Nishad M, Singh S, Tomar D. Evaluation of different Diagnostic Modalities for Diagnosis of Dental Caries: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2016;9(4):320-325.
406. Zaze AC, Dias AP, Sasaki KT, Delbem AC. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 2014;18(6):1619-1624.
407. Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am.* 1999;43(4):635-664.
408. Zero DT. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health.* 2006;6(1):9-22.
409. Zhang X, Li Y, Sun X, et al. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(12):2619-2628.
410. Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *Int J Oral Sci.* 2014;6(2):61-69.
411. Zhao J, Liu Y, Sun WB, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011;5:40.
412. Zheng J, Zhou ZR. Effect of age on the friction and wear behaviors of human teeth. *Tribol Int* 2006;39:266-73.
413. Zheng W, Ding L, Wang Y et al. The effects of 8DSS peptide on remineralization in a rat model of enamel caries evaluated by two

- nondestructive techniques. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2019 Jan-Mar;17(1):2280800019827798.
414. Zhu B, Li X, Xu X, et al. One-step phosphorylated poly(amide-amine) dendrimer loaded with apigenin for simultaneous remineralization and antibacterial of dentine. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;172:760-768.
415. Zhu S, Yang N, Zhang D. Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) modification of activated carbon for copper ions removal. *Mater. Chem. Phys*. 2009; 113(2-3):784–789.

Х. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1

Инструмент за оценка на кариес риска

Висок кариес риск

- 3 или повече нови кариозни лезии/обтурации в последните 36 месеца
- Екстрахирани зъби поради кариес в последните 36 месеца
- Чест прием на прости углехидрати (повече от веднъж дневно)
- Ксеростомия
- Химно/лъчетерапия
- Невъзможност да извършване на орално-хигиенни процедури

Среден кариес риск

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Активен кариес през последните 12 месеца | <input type="checkbox"/> Лоша орална хигиена | <input type="checkbox"/> Злоупотреба с наркотици/алкохол |
| <input type="checkbox"/> Висок титър на кариесогенни бактерии | <input type="checkbox"/> Ортодонтоско лечение | <input type="checkbox"/> Множествени обтурации |
| <input type="checkbox"/> Лоша орална хигиена в семейството | <input type="checkbox"/> Аномалии в зъбното развитие | <input type="checkbox"/> Хранителни разстройства |
| <input type="checkbox"/> Субоптимален внос на флуор | <input type="checkbox"/> Нередовни визити на денталния кабинет | <input type="checkbox"/> Гингивални рецесии |
| | | <input type="checkbox"/> Продължително кърмене |
| | | <input type="checkbox"/> Дефектни обтурации |
| | | <input type="checkbox"/> Придобити или вродени емайлови дефекти |
| | | <input type="checkbox"/> Други |
- Нисък риск = не се отбелязват рискови фактори
- Среден риск = отбелязват се само фактори за среден кариес риск
- Висок риск = отбелязан е поне един рисков фактор от групата на високия кариес риск

Информация за пациента

Клиничното проучване на реминерализация ефект на самоорганизиращ се пептид P₁₁-4 върху начални кариозни лезии по гладки повърхности е част от дисертационен труд на тема „Приложение на биомиметични реминерализиращи системи в лечението на начален емайлов кариес по гладки повърхности“.

CUROLOX® TECHNOLOGY дава възможност за лечение на началните емайлови кариеси като се регенерира емайловата структура чрез образуване на хидроксилапатитни кристали в дълбочина на лезията. Реминерализацията се осъществява чрез калциевите и фосфатните йони, доставени от слюнката. Продуктът дава възможност да се спре развитието на кариеса в началните му етапи, което ще предотврати по-нататъшното изпиляване и възстановяване на зъба. Curodont Repair е изпитано и утвърдено средство, представено на европейския пазар от 2012 година, но за първи път се използва в България.



При първото посещение пациентите се преглеждат, правят се снимки със специална камера, която показва дълбочината на емайловите кариеси и зоните с плаконатрупване, Провежда се обучение и мотивация в извършването на правилна орална хигиена. Предвиждат се още 2 контролни посещения (на 6-ти и 12-ти месец) за оценка на лечението и корекция на терапията, ако се налага.

ПРАВА НА УЧАСТНИЦИТЕ

Всички пациенти се включват доброволно в изследването и имат право да се откажат във всеки един негов етап.

ВЪЗМОЖНИ РИСКОВЕ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО

Не се предвижда възникването на рискове, тъй като до момента няма регистрирани странични ефекти от приложението на тестваната система.

Информирано съгласие

Аз, долуподписаният/та

.....
.....

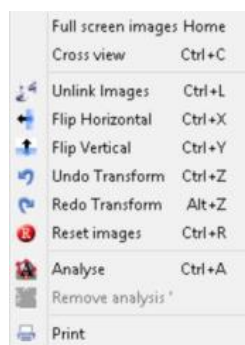
давам съгласието си да участвам доброволно в клинично за проучване на реминерализацията ефект на самоорганизиращ се пептид P₁₁-4 върху начални кариозни лезии по гладки повърхности. Предварително бях писмено запознат/а с целите и методите на неговото провеждане. Уведомен/а съм, че за лечението ми няма да се използват методи и лекарствени вещества, които не са сертифицирани. Данните, свързани с мен и моето здраве, са поверителни и ще бъдат използвани единствено и само за целите на научното изследване.

Дата.....

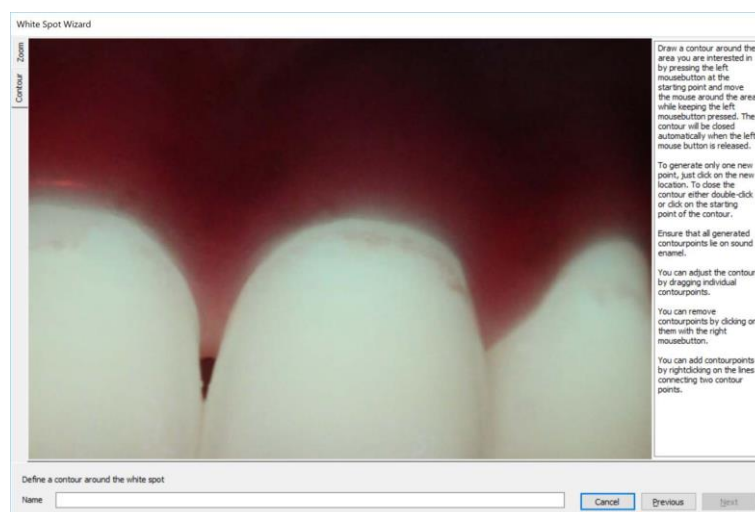
Подпис:

Протокол за диагностика на начални кариозни лезии с Qray Cam Pro

1. Извършва се клинична орална хигиена като се отстраняват зъбен камък, плака и оцветявания.
2. Камерата Qray Cam Pro се свързва с лаптопа и се стартира *QrayCam Pro full clinical software*.
3. Камерата се поставя на статив, а обективът ѝ се позиционира под ъгъл приблизително 90° спрямо изследваната повърхност.
4. Фотодокументацията се извършва след подсушаване на зъбните повърхности с разсеяна въздушна струя за 5 секунди в затъмнен кабинет.
5. От програмата се избира **White Spot Analysis**. Определя се зона от снимката, която подлежи на анализ и в близост до нея се кликва с десен бутон на мишката. Появява се падащо меню:

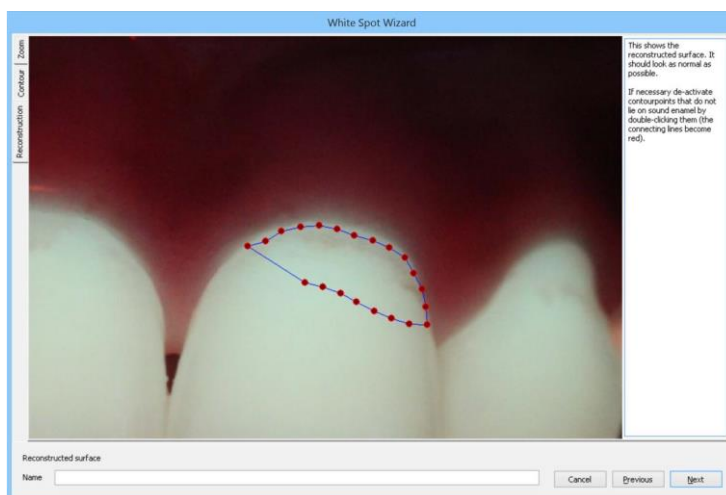


6. От менюто се избира опция **Analyse**, след което се появява следния прозорец:

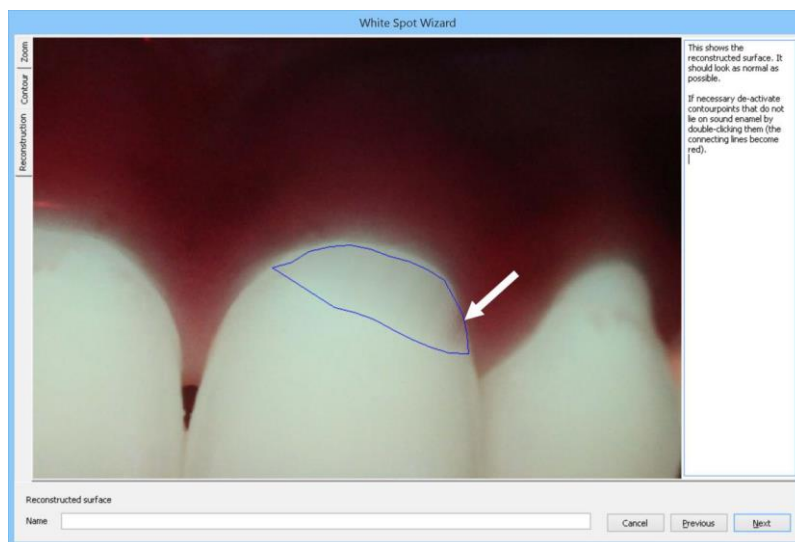


Програмата автоматично увеличава размера на областта, в която се намира лезията. Ако има нужда от корекция на избраното поле, се кликва върху бутон **Zoom** в горния ляв ъгъл на прозореца.

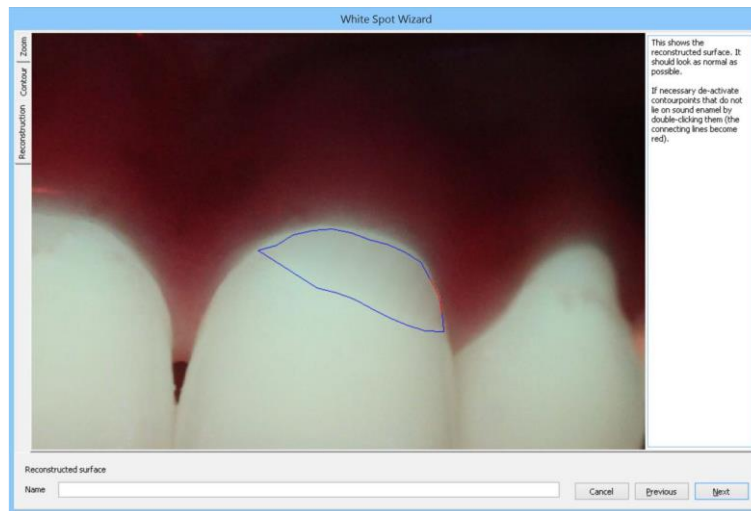
7. Чрез продължително натискане на левия бутон на мишката върху изображението операторът очертава всяка бяла лезия, която подлежи на анализ. Границите на очертаването се разполагат в съседната видима здрава структура. При доближаването на края на контура към началната точка на измерване, очертаването се затваря автоматично:



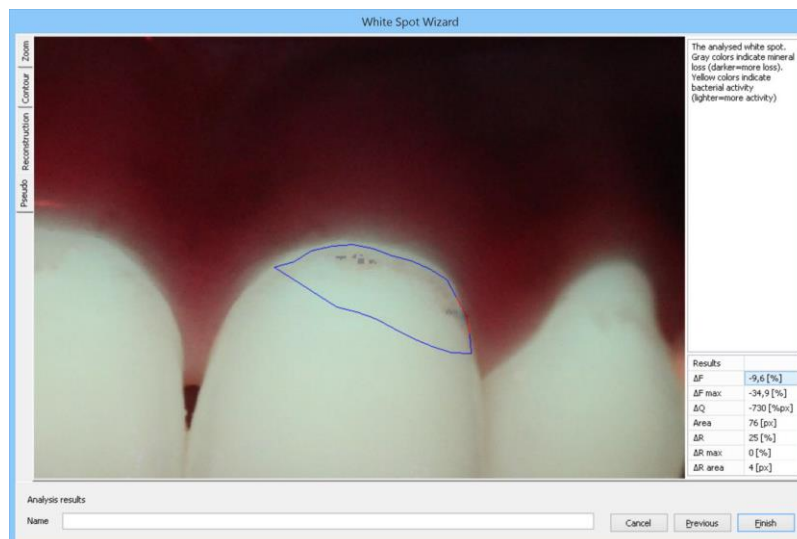
8. Софтуерът самостоятелно разпознава границите на очертаването като разположени в здрава структура. За да се избегне грешка, операторът наблюдава дали линията е разположена в интактна емайлова зона. В посочения пример се установява, че в цервикалната зона, линията не е разположена в интактно поле.



9. За корекция се кликва върху **Previous** и след това се кликва два пъти върху очертаването в близост до бялата стрелка, за да се инактивира контурът в тази област (синята линия се променя в червена). След това се избира **Next**.



10. Ако полученият резултат задоволителен се избира **Next**, за да се визуализират резултатите от анализа на лезията.



11. В края анализът се обозначава в зависимост от изследваните зъб и повърхност. Чрез избирането на **Finish**, софтуерът се връща в изходна позиция. Долу вдясно се намират данните от всеки извършен анализ:

ΔF - Определя дълбочината на лезията.

ΔQ - Определя обема на лезията.

Area_{ΔF} - Площ с **ΔF** равно или по-малко от специфичната прагова стойност на **ΔF** (по подразбиране – 5%).

ΔR - Свързва се с присъствието на порфирины и индиректно показва бактериалната активност.

Q Ray v 1.28: Demonstration database

Simple Hygiene Score: 12/16 Spot Analysis

Patient: 111111

2016-08-14

Patients

Results QI-D settings Updates Options

Created on 2016-08-14 13:43:53

Calculated on 2016-08-14 20:18:15 2016-08-14 20:31:23

Contour Plaque 1 821

Simple Hygiene Score 1 -

Area >= 100% 1 [%] -

Area >= 120% 0 [%] -

Tooth Area 14990 [px] -

ΔF max - -12.6 [%]

ΔF Average - -7.0 [%]

ΔQ - -252 [Npx]

Кратки биографични данни



Д-р Александър Бойчев Бончев е роден на 28.10.1989 г. в гр. Монтана.

- **2014 г.** – висше образование, магистър по дентална медицина, ФДМ, МУ-София.

- **2015-2017 г.** – хоноруван асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ-София.

- От **2017 г.** – асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ-София.

- От **2018 г.** – специализант по „Оперативно зъболечение и ендодонтия“, ФДМ, МУ-София.

Д-р Александър Бончев има публикации в научни специализирани издания и участия в научни форуми.

Член е на БЗС, БНСД.

Има участие в пет научно-изследователски проекта.

Владее писмено и говоримо английски и немски език.